

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare

Dottorato di Ricerca in Patologia e Fisiopatologia Molecolare



***“Inattivazione funzionale del fattore di trascrizione Pax8 mediante OCR
(Oligomerization Chain Reaction)”***

Coordinatore:
Prof. Vittorio Enrico Avvedimento

Candidato:
Dott.ssa Barbara D’Andrea

Docente guida:
Dott.ssa Stella Zannini

Anno 2006/2007

INTRODUZIONE

La cellula follicolare tiroidea: espressione dei geni tiroide-specifici

Le cellule follicolari tiroidee e le cellule parafollicolari o cellule C sono i due diversi tipi cellulari responsabili della duplice funzione endocrina della ghiandola tiroidea. La tiroide nei mammiferi e' localizzata nella regione del collo e la sua morfogenesi comincia allo stadio di sviluppo embrionale compreso tra il giorno 8-8.5, quando poche cellule della parete ventrale della faringe primitiva sono specificate o determinate a seguire tutti i passaggi di un programma di sviluppo che le portera' verso un fenotipo tiroideo differenziato (De Felice and Di Lauro, 2004). Allo stadio di sviluppo embrionale compreso tra i giorni 15-16, l'organogenesi della tiroide e' completa ed essa risulta formata dai due tipi cellulari suddetti: le cellule C e le cellule follicolari. Le cellule C sono localizzate tra gli spazi interfollicolari, maggiormente in posizione parafollicolare, e sono preposte alla produzione di calcitonina. Le cellule follicolari formano i follicoli tiroidei, strutture sferiche adibite alla conservazione e al rilascio controllato degli ormoni tiroidei (Mauchamp et al., 1998). Tali cellule sono altamente polarizzate: nella regione apicale della membrana sono presenti la tireoperossidasi (TPO) e due ossidasi tiroidee recentemente identificate (ThOX1 e ThOX2), mentre il recettore del TSH (TSHr) e la pompa dello iodio (NIS) sono localizzati nella membrana basolaterale (Figura 1). Nel lume del follicolo vi e' la tireoglobulina (Tg), una complessa molecola glicoproteica che serve come matrice per la formazione degli ormoni tiroidei e come "banca" di deposito degli stessi. L'espressione genica di tutte queste proteine garantisce il caratteristico fenotipo della cellula tiroidea differenziata (Damante and Di Lauro, 1994; Damante et al., 2001). Dei geni *Tg*, *TPO*, *NIS* e *TSHr* e' stata caratterizzata la regione del promotore ed e' noto almeno in parte il meccanismo preposto alla trascrizione specifica in cellule tiroidee. La regione del promotore che permette la trascrizione tiroide-specifica del gene *Tg* e' situata tra le basi -170 e +1 rispetto al sito d'inizio della trascrizione (Damante and Di Lauro, 1994; Sinclair et al., 1990). Fattori di

trascrizione, sia ubiquitari che tessuto-specifici, riconoscono siti di legame in questa regione (Figura 2A). Nel promotore del gene *Tg* sono presenti tre siti di legame del fattore di trascrizione TTF-1 (Civitareale et al., 1989; Guazzi et al., 1990), i quali si trovano in tre regioni denominate A, B e C. La regione C e la regione A sono essenziali per l'attività del promotore. Il sito di legame di Pax8 (Plachov et al., 1990), un altro fattore di trascrizione tiroide specifico, si sovrappone al sito di legame di TTF-1 nella regione C (Zannini et al., 1992), mentre nella regione A il sito di legame di un fattore di trascrizione ubiquitario (UFA, *ubiquitous factor A*) si sovrappone a quello di TTF-1. Meno rilevante è la funzione della regione B (Sinclair et al., 1990). La regione K, posta tra le regioni B e C, presenta il sito di legame per il fattore di trascrizione tiroideo Foxe1 (Zannini et al., 1997).

L'organizzazione del promotore del gene *TPO* è molto simile a quella del promotore del gene *Tg* (Figura 2B). Esso presenta tre siti di legame per TTF-1 nelle regioni A, B e C. Nella regione C il sito di legame di Pax8 si sovrappone a quello di TTF-1, mentre nella regione B un sito di legame di un fattore di trascrizione ubiquitario (UFB, *ubiquitous factor B*) si sovrappone a quello di TTF-1. Il sito di legame di Foxe1 è situato nella regione Z posta tra le regioni B e C (Francis-Lang et al., 1992).

È interessante notare l'omologia dei promotori dei geni *Tg* e *TPO*, geni non correlati tra loro se non per l'espressione tiroide-specifica. Tale organizzazione, ed in particolare la sovrapposizione dei siti di legame di Pax8 e TTF-1, è ben conservata anche tra le diverse specie studiate, il che favorisce l'ipotesi che questa struttura abbia un ruolo funzionale.

Mentre i promotori dei geni *Tg* e *TPO* presentano un alto livello di omologia, i promotori dei geni *NIS* e *TSHr* appaiono invece organizzati in maniera diversa, anche se sono stati evidenziati, in entrambi i promotori, ruoli importanti per gli stessi fattori di trascrizione tiroide-specifici. Ad esempio, è stato dimostrato che il fattore TTF-1 lega il promotore del gene *NIS* attivandone la trascrizione (Ohmori et al., 1998). Inoltre è stato localizzato un *enhancer* a monte del promotore del gene *NIS* e la sua caratterizzazione ha portato all'identificazione di due siti di legame per Pax8 e di una sequenza *CRE-like* (Ohno et al., 1999). È stato dimostrato che l'attività trascrizionale di questo *enhancer* è strettamente

influenzata dall'integrità di uno dei siti di legame per Pax8 e della sequenza *CRE-like*. Pax8 quindi si è dimostrato essere un fattore chiave anche nella regolazione di NIS. Recentemente sono state caratterizzate le proteine che legano la sequenza *CRE-like* e che attivano sinergicamente la trascrizione di tale gene insieme a Pax8 (Chun et al., 2004).

Il promotore del TSHr è stato ampiamente studiato ed è stata identificata la regione minima regolata dal TSH avente attività di promotore. All'interno di questa regione sono stati caratterizzati diversi siti di legame, alcuni per fattori non tiroide-specifici, altri per TTF-1 (Ohmori et al., 1995). Non è stata però dimostrata una rilevanza funzionale dell'eventuale legame di TTF-1 al promotore di TSHr.

Fattori di trascrizione tiroidei

La regolazione dell'espressione genica da parte dei fattori di trascrizione è garantita generalmente da domini in grado di legare il DNA in maniera sequenza specifica e da domini di interazione con altre proteine. In base alla struttura del dominio di legame al DNA, i fattori di trascrizione vengono suddivisi in famiglie. Le differenze a livello della sequenza amminoacidica del dominio di legame al DNA tra i componenti di una stessa famiglia giustificano le differenze nei siti di legame sul DNA per tali fattori.

Fino ad oggi sono stati identificati quattro fattori indispensabili per l'espressione genica tessuto-specifica in tiroide e sono: TTF-1 (*Thyroid Transcription Factor-1*), TTF-2/Foxe1 (*Thyroid Transcription Factor-2*), Pax8 (*paired box gene 8*) ed Hex (*hematopoietically expressed homeobox*) (Damante et al., 2001; Pellizzari et al., 2000).

TTF-1 è una proteina di 372 aminoacidi, il cui dominio di legame al DNA è rappresentato da un omeodominio (Civitareale et al., 1989; Guazzi et al., 1990). La sua espressione nel topo e nell'uomo è limitata al polmone ed alla tiroide, mentre è estesa anche al diencefalo e al telencefalo durante lo sviluppo embrionale (Guazzi et al., 1990; Lazzaro et al., 1991). La nomenclatura di questa proteina è stata più volte modificata. Infatti essa è anche detta Nkx2-1, dal momento che appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione Nkx2 (Price et al.,

1992), e T/EBP, perche' capace di legare la regione *enhancer* del promotore del gene *TPO* (Mizuno et al., 1991). Il suo nome ufficiale oggi e' TTF-1/Nkx2-1. Per semplicita' nel corso di questo lavoro di tesi tale fattore sara' chiamato esclusivamente TTF-1.

Saggi di transattivazione in cellule HeLa hanno dimostrato che TTF-1 è in grado di attivare il promotore del gene *Tg* ed, in misura minore, quello del gene *TPO* (De Felice et al., 1995; Francis-Lang et al., 1992). Il legame alla sequenza consenso in tali promotori è permesso dall'omeodominio, un dominio proteico presente in molti fattori importanti per lo sviluppo embrionale sia in *Drosophila* che nei vertebrati (Bachiller et al., 1994). La presenza di TTF-1 *in vivo* non è sufficiente a garantire l'espressione dei geni *Tg* e *TPO*. Infatti, l'espressione di TTF-1 in tessuti diversi dalla tiroide, quali il polmone, non basta ad attivare la trascrizione dei geni *Tg* e *TPO*, bensì attiva la trascrizione dei geni polmone-specifici, come le proteine surfattanti A, B e C (Bruno et al., 1995; Bohinski et al., 1994; Yan et al., 1995; Kelly et al., 1996; Zhang et al., 1997). E' stata dimostrata la co-espressione dei fattori TTF-1 e GATA 6 sia *in vivo*, nell'epitelio respiratorio, che *in vitro*, nelle cellule epiteliali respiratorie. La presenza di entrambe le proteine in tali cellule determina un effetto sinergico sull'attivazione trascrizionale del promotore SP-C (Liu et al., 2002). TTF-1 nelle stesse cellule e' co-espresso con TAZ, un co-attivatore trascrizionale recentemente identificato (Kanai et al., 2000), ed anche in questo caso la co-presenza di entrambi i fattori determina una cooperazione funzionale sul promotore del gene *SP-C* (Park et al., 2004). Gli esperimenti di inattivazione genica hanno rivelato molte funzioni importanti del fattore TTF-1 *in vivo*. Il fenotipo dei topi *knock-out* per TTF-1 e' risultato piuttosto complesso, il che risulta in accordo con l'espressione di tale gene in diversi organi. Topi *knock-out* per TTF-1 muoiono alla nascita probabilmente per la presenza di un polmone ipoplastico (Kimura et al., 1996). In questi topi l'ipofisi e la tiroide sono assenti mentre l'ipotalamo è anomalo. Studi successivi, condotti ai primi stadi di sviluppo embrionale, hanno dimostrato che negli embrioni *Titf1*^{-/-} e' presente il primordio tiroideo nella sua corretta posizione il quale va però incontro ad un processo apoptotico (Kimura et al., 1999). Quindi TTF-1 e' un fattore essenziale per la sopravvivenza dei precursori delle cellule tiroidee ma non e' richiesto per la loro iniziale formazione.

TTF-2 appartiene alla famiglia di proteine contenenti il dominio *helix/forkhead*, per cui il suo nome ufficiale oggi è Foxe1. È stato originariamente identificato come una proteina nucleare tiroide-specifica in grado di legare una sequenza di DNA presente su entrambi i promotori dei geni *Tg* e *TPO* in seguito a stimolazione ormonale (Civitareale et al., 1989; Santisteban et al., 1992). Durante lo sviluppo embrionale del topo, Foxe1 è espresso in tiroide e nell'ectoderma intestinale e cranio-faringeo. Nell'adulto l'espressione di Foxe1 persiste nelle cellule follicolari tiroidee. La generazione di topi *knock-out* per Foxe1 (De Felice et al., 1998) ha permesso di far luce sul ruolo di questo fattore nello sviluppo della ghiandola tiroidea. I topi *Foxe1*^{-/-} muoiono alla nascita: essi sono caratterizzati da palatoschisi e da un quadro di ipotiroidismo neonatale simile a quello mostrato nella disgenesia tiroidea umana. L'analisi di tali topi ha permesso di evidenziare nei primi stadi di sviluppo embrionale un normale primordio tiroideo, il quale è incapace però di raggiungere la sua destinazione finale. Da ciò si deduce che Foxe1 è essenziale per la migrazione dei precursori delle cellule follicolari tiroidee ma non per la loro sopravvivenza e/o per il loro differenziamento. Il ruolo di Foxe1 nell'adulto è ancora oggetto di studi. I saggi funzionali condotti in colture cellulari hanno dimostrato che questa proteina può funzionare da repressore trascrizionale promotore-specifico (Perrone et al., 2000), ma il suo ruolo *in vivo* potrà essere chiarito quando sarà possibile analizzare il fenotipo derivante dall'inattivazione genica condizionale di *Foxe1*.

Pax8 è il terzo fattore tiroide specifico noto. Come per gli altri due fattori di trascrizione appena descritti la sua espressione in tiroide non è esclusiva essendo esso espresso anche nel rene e, durante la vita embrionale, in alcune aree del sistema nervoso centrale (Plachov et al., 1990). Le proteine della famiglia dei geni Pax, di cui sino ad oggi fanno parte nove geni, sono caratterizzate dal *paired domain*, un dominio di 128 amminoacidi localizzato nella regione N-terminale che permette il legame al DNA (Gruss and Walther, 1992). Questo dominio, identificato originariamente in *Drosophila*, è caratterizzato da due subdomini strutturalmente indipendenti, il subdominio PAI ed il subdominio RED, ognuno dei quali contiene un motivo *helix-turn-helix*. La presenza di due subdomini indipendenti rende ogni gene Pax capace di riconoscere un'ampia gamma di sequenze di DNA e di legare tali sequenze mediante tipologie di legame diverse

da proteina a proteina. Sono state identificate sequenze che legano specificamente il *paired domain* sui promotori dei geni *Tg* e di *TPO* (Zannini et al., 1992). Pax8 fa parte di una sottoclasse dei geni Pax, a cui appartengono anche Pax2 e Pax5 (Walther et al., 1991; Dorfler et al., 1996), caratterizzata dalla presenza parziale di un altro dominio di legame al DNA, l'omeodominio, e da una sequenza di 8 residui amminoacidici, detta octapeptide, frapposta tra l'omeodominio ed il *paired domain*. Tuttavia, fino ad oggi, non è ancora nota la funzione né dell'omeodominio parziale, né dell'octapeptide. La regione carbossiterminale, che comprende il dominio di transattivazione (Poleev et al., 1997), è sottoposta a splicing alternativo che genera sei diverse isoforme della proteina (Poleev et al., 1995). L'isoforma **a**, considerata la forma *full length*, è quella maggioritaria in tiroide (Poleev et al., 1995).

Hhex è un fattore di trascrizione contenente un omeodominio, inizialmente identificato nelle cellule ematopoietiche (Crompton et al., 1992; Bedford et al., 1993). È una proteina di 271 amminoacidi caratterizzata all'N-terminale da una regione ricca di prolina, probabilmente coinvolta nella regolazione trascrizionale dei geni *target* (Tanaka et al., 1999). La proteina Hhex è espressa in molti tessuti inclusa la ghiandola tiroidea (Thomas et al., 1998; Bogue et al., 2000). L'analisi degli embrioni *Hhex*^{-/-} ha dimostrato il ruolo essenziale di tale fattore durante la morfogenesi tiroidea (Martinez-Barbera et al., 2000). I topi *knock-out* per Hhex presentano un primordio tiroideo ipoplastico o assente. Studi più dettagliati hanno mostrato che in assenza di Hhex anche gli altri fattori TTF-1, Foxe1 e Pax8 sono presenti in quantità inferiori negli stadi più tardivi dello sviluppo embrionale. Di conseguenza non è escluso che il fenotipo dei topi *Hhex*^{-/-} sia il risultato dell'assenza di diversi fattori di trascrizione tiroide-specifici e di una mancata cross-regolazione degli stessi. Queste ipotesi sono supportate da recenti studi condotti *in vitro*, che dimostrano l'esistenza di un *feedback* positivo tra gli stessi fattori tiroide-specifici. Per esempio è stato dimostrato che sia TTF-1 che Hhex aumentano l'attività del promotore del gene *Hhex*, per cui in saggi di co-trasfezione essi attivano il promotore suddetto in maniera additiva (Puppini et al., 2003). Hhex interagisce funzionalmente anche con Pax8 nell'attivazione trascrizionale del proprio promotore (Puppini et al., 2004).

Questa fitta rete di interazioni funzionali, che ha luogo nella cellula tiroidea differenziata, in alcuni casi rende difficile comprendere il ruolo che riveste ciascun fattore nella determinazione e nel mantenimento del fenotipo tiroide-specifico. La disponibilità delle linee cellulari PC Cl3 e FRTL-5, derivanti rispettivamente da tiroide di ratti Fischer di 18 mesi e di 3 settimane, ha agevolato lo studio del differenziamento tiroideo. Queste linee cellulari, anche se hanno perso la caratteristica di essere polarizzate tipica delle cellule follicolari tiroidee *in vivo*, conservano lo stesso profilo di espressione genica. Per fare un esempio, in tali cellule il messaggero del gene *Tg* contribuisce al 1- 5% dell'mRNA cellulare. Queste cellule, inoltre, sono in grado di accumulare iodio, anche se non sintetizzano gli ormoni T3 e T4, e sono dipendenti dall'ormone TSH per la crescita. Un approccio classico per comprendere i meccanismi che conducono al differenziamento della cellula tiroidea, e' stato quello di studiare il ruolo svolto dai fattori di trascrizione nella regolazione dell'espressione di quei geni che ne determinano il fenotipo differenziato.

Il fattore di trascrizione Pax8 e' un "master gene" del differenziamento tiroideo

L'importanza dei fattori TTF-1 e Pax8 nel mantenimento del fenotipo differenziato delle cellule tiroidee in coltura e' dimostrato dal fatto che le cellule FRTL-5 trasformate, non esprimenti Pax8 e TTF-1, perdono il fenotipo differenziato (Damante and Di Lauro, 1994). Negli ultimi anni sono state ottenute almeno tre evidenze che dimostrano il ruolo fondamentale del fattore di trascrizione Pax8 nel differenziamento tiroideo.

La prima evidenza e' stata ottenuta utilizzando il modello sperimentale delle cellule tiroidee in coltura. E' stato dimostrato che in cellule PC Cl3 trasformate dall'antigene middle T di Polyoma (denominate PCPy) si perde l'espressione dei marcatori del differenziamento *Tg*, *TPO* e *NIS*. Questo evento si realizza in concomitanza con la mancata espressione del fattore Pax8, ma non dei fattori TTF-1 e Foxe1. L'introduzione di un vettore di espressione codificante Pax8 in cellule PCPy, seguito dalla sintesi della proteina esogena, risulta sufficiente per

riattivare l'espressione endogena di Tg, TPO e NIS e quindi per ripristinare il fenotipo differenziato delle cellule PC Cl3 (Pasca di Magliano et al., 2000).

La seconda evidenza è stata ottenuta mediante l'inattivazione attraverso ricombinazione omologa del gene *Pax8* nel topo. L'analisi dei topi *knock-out* per il gene *Pax8* ha confermato il suo ruolo fondamentale in tiroide. Nonostante *Pax8* sia espresso, oltre che in tiroide, anche nel cervello e nel rene, i topi privi di entrambe le copie del gene *Pax8* non presentano anomalie fenotipiche né a livello del rene né a livello del cervello. Diversamente, questi topi mostrano un difetto evidente a livello della ghiandola tiroidea, in particolare non vi sono né follicoli né cellule follicolari tiroidee ma il rudimento ghiandolare presente è quasi completamente composto dalle cellule C (Mansouri et al., 1998). Un'analisi istologica più dettagliata nei primi stadi di sviluppo embrionale ha rivelato che negli embrioni *Pax8*^{-/-} il diverticolo tiroideo è capace di evaginare dall'endoderma, ma in assenza di *Pax8* esso appare più piccolo di quello presente in topi normali al giorno 11.5 e completamente privo di cellule follicolari al giorno 12.5. Pertanto, la sola presenza del fattore trascrizionale TTF-1, regolarmente espresso nei topi *Pax8*^{-/-} non è sufficiente per il corretto sviluppo della ghiandola tiroidea e per la sopravvivenza delle cellule follicolari tiroidee (Mansouri et al., 1998).

La terza evidenza è stata ottenuta da studi sull'uomo ed in particolare su pazienti affetti da ipotiroidismo congenito. L'ipotiroidismo congenito è una patologia endocrina comune (frequenza 1/3500) caratterizzata da elevati livelli di TSH in risposta a ridotti livelli di ormoni tiroidei. I soggetti affetti da tale patologia presentano una funzione tiroidea difettiva dovuta nella maggioranza dei casi a difetti nell'organogenesi della ghiandola. In circa ottanta casi su cento si osserva agenesia, ectopia o ipoplasia tiroidea (De Felice et al., 2004). In similitudine con il modello murino, il ruolo di *Pax8* in questa patologia sembra essere importante. Infatti, in pazienti affetti da ipotiroidismo congenito sporadico e familiare sono state evidenziate mutazioni missenso e non senso nella regione codificante del gene *Pax8* (Macchia et al., 1998; Macchia et al., 1999; Vilain et al., 2001; Congdon et al., 2001; Komatsu et al., 2001).

Quindi i tre modelli descritti mostrano chiaramente il ruolo di importanza che ricopre Pax8 all'interno del complesso meccanismo molecolare del differenziamento tiroideo.

Inattivazione funzionale di proteine cellulari mediante la generazione di dominanti-negativi

Differenti approcci funzionali e genetici vengono utilizzati per ottenere l'inattivazione di proteine cellulari con l'obiettivo di studiare la loro funzione. L'inattivazione funzionale è largamente usata in sistemi modello dove l'ablazione genetica del gene bersaglio (*knock-out*), non consente di studiarne gli effetti perché ad esempio letali.

Attualmente, l'inattivazione funzionale di una proteina può essere ottenuta mediante diversi approcci: (i) interferenza sulla sintesi proteica (RNA-antisense e RNA-interferenza); (ii) utilizzo di molecole a basso peso molecolare in grado di legare ed inibire la proteina bersaglio; (iii) stimolazione della degradazione proteica; (iv) uso di specifici dominanti-negativi (ad esempio enzimi mutati privi di attività catalitica o fattori trascrizionali privati del loro dominio di attivazione).

In questa ultima strategia la funzione del gene è bloccata a livello proteico. In particolare, si determina l'inattivazione funzionale di una proteina bersaglio attraverso la sovraespressione di una sua variante inibitoria (dominante-negativo). Per una stessa proteina possono essere generati diversi dominanti-negativi, poiché le proteine sono spesso dotate di differenti domini funzionali che possono essere mutati indipendentemente, come ad esempio, siti per l'oligomerizzazione, per il legame del substrato, per la catalisi.

Spesso, l'espressione delle molecole dominanti-negative viene posta sotto il controllo di domini regolatori, come il *Glucocorticoid response element* (GRE), l'*Hormone-binding domain* (HBD) mutato G525R del recettore per l'estrogeno (ERTM). La fusione con tali domini rende inducibile e non costitutiva l'espressione di tali molecole, determinando il vantaggio di poter studiare anche dominanti-negativi che risultano tossici per la cellula.

Il dominante negativo può svolgere il suo ruolo di antagonista con meccanismi diversi. Un esempio è rappresentato dal controllo della trascrizione dell'operone *lacZYA* dove esiste una mutazione dominante-negativa del repressore *LacI*. Una caratteristica importante per la funzione del repressore è la sua natura di proteina multimerica. Le subunità si associano casualmente all'interno della cellula, formando il tetramero attivo. Quando sono presenti due alleli diversi del gene *LacI*, possono associarsi subunità prodotte da ciascuno di essi, dando origine a un tetramero con proprietà diverse da quelle dell'omotetramero. Questo tipo di interazione tra subunità è una caratteristica delle proteine multimeriche e viene indicata col termine complementazione interallelica.

Tra alcuni repressori mutati si verifica la complementazione negativa, come si può vedere nella combinazione tra i geni *LacI^d* e *LacI⁺*. Da sola, la mutazione *LacI^d* porta alla formazione di un repressore che non è in grado di legare l'operatore, quindi è costitutiva come tutti gli alleli *LacI*. Poiché inattiva il repressore, la mutazione di tipo *LacI⁻* è recessiva rispetto al tipo selvatico. Tuttavia, la mutazione *-d* indica che questa variante del tipo negativo è dominante se abbinata ad un allele di tipo selvatico. Queste mutazioni sono chiamate *trans*-dominanti, o anche dominanti-negative.

La ragione della dominanza risiede nel fatto che l'allele *LacI^d* produce una subunità "cattiva", che non soltanto non è in grado di legare il DNA dell'operatore, ma ha anche la proprietà, una volta entrata a far parte di un tetramero, di impedire il legame di qualsiasi subunità "buona". Ciò dimostra che la repressione è una funzione dell'intero tetramero, non del singolo monomero. Questo effetto può anche essere visto *in vitro*, semplicemente mescolando subunità "cattive" e "buone" del repressore.

Le mutazioni *LacI^d* sono localizzate nel sito per il legame al DNA della subunità del repressore. Ciò spiega la capacità di queste mutazioni di impedire che i tetrameri misti si leghino all'operatore: la riduzione del numero dei siti di legame riduce infatti l'affinità del tetramero per l'operatore.

Un'altra tipica mutazione a carattere dominante negativa è stata caratterizzata in una forma mutata di p53. Il fattore trascrizionale p53 è un oncosoppressore implicato nel controllo del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nella stabilità genomica. Il gene *p53* codifica per una proteina composta da un dominio centrale

di legame al DNA, da un dominio di transattivazione all'N-terminale, e un dominio di tetramerizzazione al C-terminale. La forma attiva di p53 e' un tetramero di quattro identiche subunita', associate dimero a dimero. Nello stato tetrameric, p53 lega il DNA che contiene quattro ripetizioni di un motivo pentamerico 5'-Pu-Pu-C-A/T-3' (Pu/Purina).

Tra i diversi meccanismi postulati per inattivare p53, la mutazione VAL135/p53 e' in grado di cambiare la normale conformazione *wtp53* determinando l'inattivazione del tetramero eterocomposto (VAL135/p53- *wtp53*). Il mutante, infatti, agisce come un dominante-negativo propagando il suo effetto in un modo simile a quello prionico, cioe' forzando una normale proteina ad adattarsi in una conformazione 3-D mutata (Blagosklonny et al., 2000).

La metodica della “*Oligomerization Chain Reaction*” (OCR)

La “*Oligomerization Chain Reaction*” (OCR) e' una tecnica basata sulla fusione del “*self-associating coiled-coil domain*” (CC) del fattore nucleare “*Promyelocytic leukemia*” (PML) ad una proteina bersaglio che e' capace di formare etero/omo-complessi. PML appartiene ad una famiglia di geni, la famiglia TRIM, che contengono il cosi' chiamato “*Tripartite motif*” (Reymond et al., 2001), che include il dominio CC. Nella Leucemia Promielocitica Acuta, il locus genico di PML e' implicato in una traslocazione cromosomiale con il locus genico per il recettore dell'acido retinoico (RAR), determinando la formazione della proteina di fusione PML-RAR. Questa nuova proteina si comporta come un recettore alterato dell'acido retinoico, interferendo con il normale differenziamento ematopoietico. Infatti, differentemente da RAR, la proteina di fusione PML-RAR forma dei complessi oligomerici attraverso il dominio CC presente in PML (Salomoni et al., 2000), che ricordiamo possiede una naturale predisposizione ad auto-associarsi con altri domini CC. L'oligomerizzazione e' sicuramente il principale determinante che porta all'alterazione del normale funzionamento di RAR nel contesto della proteina di fusione PML-RAR, rappresentando cosi' un nuovo meccansimo di attivazione oncogenica. Infatti, e' stato dimostrato che la sola fusione del dominio CC di PML con RAR (in assenza dell'ulteriore sequenza di

PML) e' sufficiente e necessaria affinche' RAR diventi leucogenico, incrementando la stabilita' della sua associazione con il repressore nucleare (N-CoR)/complesso istone deacetilasi (HDAC), e portando ad una aberrante repressione dei geni bersaglio di RAR (Lin et al., 2000).

L'incremento di legame di PML-RAR al N-CoR comporta un incremento della repressione trascrizionale e piu' alte concentrazioni di acido retinoico sono necessarie per dissociare PML-RAR da N-CoR revertendo la repressione ottenuta attraverso sia PML-RAR che CC-RAR (Minucci et al., 2000).

L'oligomerizzazione tramite il dominio addizionale CC del fattore nucleare "*Promyelocytic leukemia*" (PML), e la naturale formazione di etero-complessi ed omo-complessi (Contegno et al., 2002; Napolitano et al., 2003), potenzia la "*Oligomerization Chain Reaction*" portando alla formazione di complessi ad alto peso molecolare ed alla inattivazione funzionale della proteina bersaglio mediante un effetto dominante-negativo (Figura 3). Da queste evidenze, fattori in grado di interagire mediante la formazione di etero-complessi, come i fattori trascrizionali, possono essere considerati un valido bersaglio per la OCR.

SCOPO DEL PROGETTO

Le differenze fenotipiche che distinguono le varie specie di cellule in un eucariota superiore sono dovute, in gran parte, a differenze nell'espressione dei geni che codificano per proteine. La maggior parte degli eventi regolatori responsabili del controllo dell'espressione dei geni avviene all'inizio della trascrizione, per cui la regolazione della trascrizione di geni tessuto-specifici è il punto centrale del differenziamento eucariotico. Un chiaro esempio di quanto detto è fornito dalle cellule follicolari tiroidee, le quali esprimono i geni considerati marcatori del differenziamento tiroideo, rappresentati dalla tireoglobulina (Tg), tireoperossidasi (TPO), il trasportatore del sodio (NIS) ed il recettore del TSH (TSHr). Pax8 è un fattore di trascrizione importante per l'espressione di questi geni. Nel corso degli anni, esperimenti sia *in vitro* che *in vivo* hanno permesso di evidenziare in maniera sempre più convincente l'importanza che ha Pax8 nella determinazione e nel mantenimento del fenotipo differenziato delle cellule follicolari tiroidee, tanto da fargli assumere il ruolo di "master gene" del differenziamento tiroideo. In aggiunta a Pax8, anche il fattore di trascrizione TTF-1 risulta essere fondamentale per lo sviluppo ed il differenziamento tiroideo. Risultati ottenuti in passato nel nostro laboratorio, suggerenti una probabile cooperazione funzionale tra Pax8 e TTF-1 (Pasca di Magliano et al., 2000), si aggiungono ad ulteriori lavori presenti in letteratura che evidenziano una cooperazione tra i fattori trascrizionali Pax8 e TTF-1 nella regolazione genica del promotore *Tg* umano (Espinoza et al., 2001) e del promotore *TPO* (Miccadei et al., 2002). Queste evidenze hanno recentemente portato il nostro laboratorio a dimostrare che Pax8 e TTF-1 sono capaci di interagire direttamente *in vitro* e di formare un complesso funzionale *in vivo* responsabile di un'attivazione trascrizionale sinergica del promotore *Tg* (Di Palma et al., 2003).

Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di studiare maggiormente in dettaglio il ruolo funzionale di Pax8 nelle cellule tiroidee. Per studiare la funzione di un fattore di trascrizione possono essere generalmente utilizzati diversi approcci, genetici e funzionali. In alcuni casi, l'ablazione genetica di un gene bersaglio non è l'approccio migliore per studiarne il suo ruolo. Nel caso

specifico, ad esempio, i topi *Pax8*^{-/-} non sono uno strumento utile per studiare il ruolo di Pax8 nel differenziamento tiroideo poiché essi mancano completamente di follicoli e di cellule follicolari. Pertanto, in questi casi può essere indubbiamente una scelta migliore quella di optare per l'inattivazione funzionale della proteina. In tal caso, diversi metodi sono stati estensivamente utilizzati con successo (oligonucleotidi antisenso, *RNA interference*, espressione di specifici dominanti negativi), ma essi non possono essere considerati universalmente applicabili. In questo progetto di ricerca si è scelto di utilizzare una metodica innovativa, l'“*Oligomerization Chain Reaction*” (OCR), per generare l'inattivazione funzionale della proteina Pax8. I bersagli molecolari di questa metodica sono proteine capaci di auto-associarsi o di formare etero-complessi. Alla luce di quanto dimostrato recentemente sull'esistenza di un etero-complesso biochimico e funzionale formato da Pax8 e TTF-1, si è ritenuto Pax8 un buon candidato per l'utilizzo della OCR. Le nostre ipotesi sono state validate dal risultato dei nostri esperimenti, descritti nella successiva sezione “RISULTATI”, che ci hanno portato ad una efficace inattivazione funzionale del fattore di trascrizione Pax8 e del suo interattore TTF-1.

RISULTATI

Generazione della proteina chimerica CC-Pax8 e analisi della sua localizzazione sub-cellulare

Il modello suggerito in letteratura alla base della “*Oligomerization Chain Reaction*”, indotta dal dominio addizionale CC del fattore nucleare PML, si basa sulla formazione di complessi ad alto peso molecolare con conseguente inattivazione funzionale della proteina bersaglio mediante un effetto dominante-negativo. Per capire se la metodica dell’OCR poteva essere efficientemente applicata alla nostra proteina bersaglio Pax8, abbiamo effettuato una serie di esperimenti preliminari allo scopo di appurare se, così’ come riportato in letteratura, anche nel nostro caso si verificasse la condizione essenziale alla base della metodica, ovvero un’alterazione della localizzazione sub-cellulare della proteina bersaglio.

Innanzitutto, e’ stato generato il costrutto 3XFLAG-CC-Pax8, in cui il cDNA di Pax8, fuso all’estremita’ N-terminale con il dominio CC di PML, e’ stato subclonato a valle dell’epitopo FLAG nel vettore di espressione 3XFLAG-CMV-10 (SIGMA), e il costrutto 3XFLAG-CC, in cui, nello stesso vettore, e’ stato subclonato il solo dominio CC a valle dell’epitopo FLAG (vedi Materiali e Metodi). Sia il costrutto 3XFLAG-CC-Pax8 che il costrutto 3XFLAG-Pax8, il secondo gia’ disponibile in laboratorio, sono stati trasfettati transientemente in cellule HeLa. L’estratto proteico frazionato, nucleare e citoplasmatico, derivante da tali cellule e’ stato analizzato mediante Western blot con uno specifico anticorpo monoclonale anti-FLAG (SIGMA). Il risultato di questo esperimento dimostra che la proteina CC-Pax8 risulta parzialmente delocalizzata nel citoplasma delle cellule trasfettate, mentre la proteina Pax8 *wild-type*, così’ come atteso, mostra una localizzazione esclusivamente nucleare (Figura 4).

La proteina chimerica CC-Pax8 e' un dominante-negativo di Pax8

Avendo appurato che la proteina chimerica CC-Pax8 si distribuisce all'interno della cellula in maniera dissimile alla proteina Pax8 e compatibile con il meccanismo preposto ad una efficiente OCR, il passo successivo e' stato quello di analizzare il ruolo funzionale della chimera.

E' stato dimostrato, mediante saggi di trasfezione transiente in cellule HeLa, che Pax8 e' capace di attivare la trascrizione del costrutto *reporter* CP5-CAT in cui il promotore sintetico CP5, costituito dal sito di legame per Pax8 disposto cinque volte in tandem, e' subclonato a monte del gene reporter CAT (Missero et al., 1998). Per studiare l'attivita' funzionale della proteina chimerica CC-Pax8 e per investigare sull'ipotetica interferenza che questa proteina poteva generare su Pax8 *wild-type*, sono stati eseguiti esperimenti di co-trasfezione in cellule HeLa con i vettori di espressione codificanti Pax8, CC-Pax8 e il solo dominio CC, separatamente o in combinazione, e con il costrutto *reporter* CP5-CAT. Come atteso, l'espressione di Pax8 provoca l'attivazione trascrizionale del promotore CP5 mentre l'espressione di CC-Pax8 non ha alcun effetto sul promotore, sebbene la proteina chimerica conservi il dominio di transattivazione (Figura 5A). Nel caso in cui le due proteine sono co-esprese non si osserva piu' l'attivazione trascrizionale del promotore CP5 esercitata normalmente da Pax8, bensì risulta evidente una totale inibizione della sua attivita' funzionale causata dalla co-presenza della chimera CC-Pax8 (Figura 5A). Possiamo affermare con certezza che l'inattivazione funzionale esercitata da CC-Pax8 su Pax8 non e' imputabile al solo dominio CC bensì alla struttura *in toto* della proteina chimerica poiche', trasfettando un vettore di espressione codificante il solo dominio CC, in combinazione con il costrutto codificante Pax8, non si osserva alcuna alterazione funzionale del fattore di trascrizione Pax8 (Figura 5A).

Questi stessi esperimenti di co-trasfezione sono stati ripetuti utilizzando un promotore piu' fisiologico. E' stato dimostrato, mediante saggi di trasfezione transiente in cellule HeLa, che Pax8 e' in grado di attivare, seppur debolmente, la trascrizione dal costrutto *reporter* Tg-CAT in cui il promotore minimo del gene *Tg* e' subclonato a monte del gene CAT (Zannini et al., 1992). Abbiamo quindi trasfettato in cellule HeLa i vettori di espressione codificanti Pax8 e CC-Pax8,

separatamente o in combinazione, e il costrutto *reporter* Tg-CAT. Anche in questi esperimenti, così come visto per il promotore CP5, abbiamo osservato un significativo effetto dominante-negativo esercitato dalla proteina chimerica CC-Pax8 sull'attività di Pax8, effetto imputabile, anche in questo caso, alla fusione del dominio CC alla proteina bersaglio e non al solo dominio CC (Figura 5B).

Interazione tra la proteina chimerica CC-Pax8 e TTF-1

Studi condotti recentemente nel nostro laboratorio hanno dimostrato che Pax8 e TTF-1 sono capaci di interagire direttamente *in vitro* e di formare un complesso *in vivo* responsabile di un'attivazione trascrizionale sinergica del promotore del gene *Tg* (Di Palma et al., 2003).

Affinché l'OCR potesse essere utilizzata per modificare la funzione del complesso trascrizionale Pax8/TTF-1, requisito fondamentale per la proteina chimerica CC-Pax8 era quello di mantenere la capacità di interagire biochimicamente con TTF-1. Per dimostrare tale interazione, cellule HeLa sono state trasfettate transientemente con i vettori di espressione codificanti 3XFLAG-CC-Pax8 e TTF-1, mentre come controllo, rispettivamente positivo e negativo, le cellule sono state trasfettate, oltre che con il vettore di espressione codificante TTF-1, anche con quelli codificanti 3XFLAG-Pax8 e 3XFLAG-CC. Da queste cellule è stato preparato un estratto proteico totale il quale è stato immunoprecipitato su una resina anti-FLAG-agarosio affinity gel (SIGMA). Le proteine legate alla resina sono state eluite, separate mediante SDS-PAGE ed immunorivelate con l'anticorpo policlonale specifico per TTF-1 e successivamente con l'anticorpo monoclonale anti-FLAG (SIGMA) (Figura 6). Il risultato di questo esperimento dimostra che TTF-1 co-immunoprecipita nelle cellule HeLa esprimenti la proteina 3XFLAG-Pax8 (Figura 6, canale 2), così come atteso, ed in quelle esprimenti la proteina 3XFLAG-CC-Pax8 (Figura 6, canale 1), mentre non c'è presenza della proteina TTF-1 co-immunoprecipitata nelle cellule HeLa esprimenti la proteina 3XFLAG-CC (Figura 6, canale 3). Pertanto, risulta evidente che la proteina chimerica CC-Pax8, così come la proteina Pax8, è

capace di interagire con TTF-1 nonostante la presenza del dominio di oligomerizzazione CC il quale, oltretutto, non e' coinvolto in tale interazione.

Inattivazione trascrizionale di TTF-1 da parte della proteina CC-Pax8

Abbiamo finora dimostrato che la proteina CC-Pax8, oltre ad essere un dominante-negativo di Pax8, e' ancora in grado di interagire biochimicamente con il suo principale interattore TTF-1. Per verificare se l'interazione biochimica tra CC-Pax8 e TTF-1 avesse un risvolto funzionale coerente con un'efficiente OCR, sono stati effettuati esperimenti di trasfezione transiente in cellule HeLa.

E' stato dimostrato che TTF-1 e' capace di attivare la trascrizione, in cellule HeLa, del costrutto *reporter* C5-CAT in cui il promotore sintetico C5, costituito dal sito di legame per TTF-1 disposto cinque volte in tandem, e' subclonato a monte del gene reporter CAT (De Felice et al., 1995). In maniera analoga a quanto descritto per Pax8, abbiamo effettuato esperimenti di co-trasfezione in cui vettori di espressione codificanti CC-Pax8 e TTF-1 sono stati trasfettati, separatamente o in combinazione, in cellule HeLa insieme al costrutto *reporter* C5-CAT. Come atteso, l'espressione del solo TTF-1 provoca l'attivazione trascrizionale del promotore C5, mentre la co-espressione di CC-Pax8 comporta la totale inibizione dell'attivita' funzionale di TTF-1 su questo promotore (Figura 7A). Anche in tal caso, l'espressione del solo dominio CC non ha effetti sul ruolo funzionale di TTF-1, cosi' come descritto per Pax8 sul promotore CP5.

E' stato dimostrato, mediante saggi di trasfezione transiente in cellule HeLa, che anche TTF-1, oltre a Pax8, e' in grado di attivare la trascrizione dal costrutto *reporter* Tg-CAT (De Felice et al., 1995). Inoltre, come gia' precedentemente accennato, recenti evidenze hanno dimostrato che, oltre ad attivare la trascrizione dal promotore del gene *Tg* in maniera indipendente l'uno dall'altro, Pax8 e TTF-1 sono capaci di stimolare la trascrizione dal suddetto promotore in maniera sinergica (Di Palma et al., 2003).

Per analizzare l'interferenza esercitata dall'espressione della proteina CC-Pax8 sull'attivita' trascrizionale di TTF-1 in un contesto piu' fisiologico, e, ancor di piu', per capire se la proteina CC-Pax8 era in grado di influenzare anche il

sinergismo funzionale tra Pax8 e TTF-1, sono stati condotti esperimenti di co-trasfezione in cellule HeLa utilizzando il promotore del gene *Tg*.

Abbiamo trasfettato, nelle suddette cellule, i vettori di espressione codificanti Pax8, TTF-1 e CC-Pax8, separatamente o in combinazione, e il costrutto *reporter* Tg-CAT. Anche in questi esperimenti abbiamo utilizzato come controllo il vettore di espressione codificante il solo dominio CC. Come atteso, anche in questo caso si possono osservare sia le singole attività trascrizionali dei soli Pax8 e TTF-1, che il loro sinergismo funzionale sul promotore del gene *Tg* (Figura 7B). Inoltre, così come visto per il promotore C5, abbiamo osservato, anche sul promotore del gene *Tg*, una totale inibizione dell'attività trascrizionale di TTF-1 causata dalla co-espressione della proteina CC-Pax8 (Figura 7B). Un'evidenza ancor più interessante è data dalla totale assenza, in presenza di CC-Pax8, del sinergismo trascrizionale di Pax8 e TTF-1 sul suddetto promotore. Questi dati sono resi ancor più forti dall'assenza di effetti da parte del solo dominio CC sull'attività del complesso trascrizionale Pax8/TTF-1.

CC-Pax8 recluta TTF-1 in complessi proteici ad alto peso molecolare

Fino ad ora abbiamo dimostrato che CC-Pax8, al pari di Pax8 *wild-type*, conserva la capacità di interagire con TTF-1, a dispetto della presenza, nella proteina chimerica, del dominio di oligomerizzazione CC di PML. Inoltre, abbiamo dimostrato che CC-Pax8 funziona da dominante negativo di Pax8 e provoca l'inattivazione funzionale anche del suo principale interattore TTF-1.

Il modello molecolare alla base dell'oligomerizzazione indotta dal dominio CC di PML fuso ad una proteina bersaglio presuppone la formazione di complessi proteici non funzionali ad alto peso molecolare. Per capire se la fusione del dominio CC a Pax8 induceva, anche nel nostro sistema, la formazione dei suddetti complessi proteici è stata eseguita una cromatografia ad esclusione molecolare. A tal fine è stato preparato un estratto proteico totale da cellule HeLa trasfettate transientemente con vettori di espressione codificanti sia 3XFLAG-Pax8 e TTF-1, sia 3XFLAG-CC-Pax8 e TTF-1 selezionando un metodo di lisi, che salvaguardasse l'integrità di eventuali complessi esistenti (vedi Materiali

e Metodi). Tale lisato e' stato separato su una colonna di Sepharose 6HR (Amersham Biosciences) che presenta un *range* di separazione tra 5×10^3 – 5×10^6 . Essa e' stata precedentemente calibrata con proteine di peso molecolare noto, in modo da poter determinare il peso molecolare apparente di ciascuna frazione eluita (dati non mostrati). Le frazioni eluite sono state separate su SDS-PAGE al 10% ed analizzate mediante Western blot con l'anticorpo monoclonale specifico anti-FLAG (SIGMA) e sequenzialmente con l'anticorpo contro la proteina TTF-1. L'immunorivelazione ha indicato che le proteine Pax8 *wild-type* e TTF-1 co-eluiscono nelle frazioni 15 e 16 corrispondenti ad un peso molecolare di circa 330 kDa (Figura 8A). Invece, le proteine CC-Pax8 e TTF-1 co-eluiscono nelle frazioni 1-7 corrispondenti ad un peso molecolare compreso tra i 500 e i 1000 kDa (Figura 8B). In questo caso, la distribuzione cosi' diffusa delle due proteine e' imputabile, cosi' come suggerito dalla letteratura, alla presenza di una popolazione eterogenea di complessi etero-oligomerici di differenti grandezze.

La proteina chimerica CC-Pax8 delocalizza TTF-1 nelle cellule tiroidee

Una volta appurato che anche nel nostro sistema la fusione del dominio CC di PML alla proteina Pax8 induceva la formazione di complessi proteici ad alto peso molecolare, restava da studiare la localizzazione subcellulare dei suddetti complessi. I primi esperimenti descritti in questo elaborato dimostrano che, mentre Pax8 *wild-type* si trova esclusivamente nel nucleo di cellule HeLa transientemente trasfettate, la proteina CC-Pax8 risulta parzialmente delocalizzata nel citoplasma di tali cellule. Questa delocalizzazione, insieme alla formazione di complessi ad alto molecolare, e' coerente con il modello molecolare alla base dell'OCR descritto in letteratura il quale, attraverso la localizzazione di tali complessi al di fuori del nucleo delle cellule, giustifica l'inibizione funzionale delle proteine bersaglio che normalmente presentano una localizzazione nucleare (Contegno et al., 2002; Napolitano et al., 2003).

Nel nostro caso, il passo successivo era quello di studiare la localizzazione della proteina chimerica CC-Pax8 in un contesto cellulare piu' fisiologico quale quello delle cellule tiroidee differenziate. A tale scopo abbiamo utilizzato la linea

cellulare tiroidea PC Cl3. E' stato precedentemente dimostrato, mediante esperimenti di immunofluorescenza, che Pax8 e TTF-1 sono presenti e colocalizzano nel nucleo delle suddette cellule (Mascia et al., 2002; Di Palma et al., 2003). Per studiare la distribuzione della proteina CC-Pax8 nelle cellule PC Cl3, abbiamo trasfettato transientemente tali cellule con il vettore di espressione codificante la proteina CC-Pax8-EYFP, in cui il cDNA della proteina EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) e' fuso all'estremita' N-terminale con Pax8. L'analisi delle cellule cosi' trasfettate mediante microscopia confocale ha rivelato che la chimera CC-Pax8 e' localizzata al di fuori del nucleo delle cellule PC Cl3, ma non appare diffusa nel citoplasma bensì concentrata in grossi accumuli situati in regioni perinucleari (Figura 9, A e D). Nelle stesse cellule abbiamo analizzato la localizzazione della proteina TTF-1 endogena ibridizzando il campione con l'anticorpo Ab-1 (clone 8G7G3/1). Dall'analisi dei due segnali risulta evidente che la presenza della proteina CC-Pax8 provoca un'anomala e parziale localizzazione citoplasmatica di TTF-1 (Figura 9, B e E). Inoltre, la sovrapposizione delle immagini acquisite ci ha permesso di stabilire che la chimera CC-Pax8 e TTF-1 colocalizzano nelle stesse regioni perinucleari (Figura 9, C e F). Parallelamente, e' stato condotto un esperimento di controllo trasfettando il vettore di espressione codificante la proteina Pax8-EYFP la quale, come atteso, colocalizza con TTF-1 nel nucleo delle cellule tiroidee PC Cl3 (Figura 9, G-I).

Questi risultati, perfettamente in accordo con i dati precedentemente descritti riguardanti la localizzazione della proteina CC-Pax8 in cellule HeLa, suggeriscono che l'effetto dominante negativo esercitato dalla proteina CC-Pax8 su Pax8 *wild-type* potrebbe essere dovuto alla formazione di complessi etero-oligomerici delocalizzati in cui e' sequestrato anche TTF-1.

Conseguenze funzionali dell'espressione della proteina chimerica CC-Pax8 in cellule tiroidee: generazione e caratterizzazione di cloni stabili

Per poter studiare le conseguenze funzionali dell'espressione della proteina chimerica CC-Pax8 nel contesto delle cellule tiroidee, abbiamo generato cloni

stabili derivanti dalle cellule PC Cl3 trasfettate stabilmente con il vettore di espressione 3XFLAG-CC-Pax8. Sono stati isolati diversi cloni indipendenti nei quali e' stata analizzata l'espressione della proteina 3XFLAG-CC-Pax8 mediante Western blot. L'immunorivelazione effettuata con un anticorpo anti-FLAG (SIGMA) (dati non mostrati) ci ha permesso di identificare cinque cloni positivi che abbiamo chiamato CCP8-6, CCP8-7, CCP8-10, CCP8-17 e CCP8-23. Su questi cloni sono stati condotti esperimenti per valutare il ruolo di Pax8 nella proliferazione cellulare e ulteriormente caratterizzarne quello nel differenziamento.

E' riportato in letteratura che Pax8 e' un fattore trascrizionale probabilmente coinvolto nella proliferazione delle cellule tumorali (van der Kallen et al., 1996; Muratovska et al., 2003; Au et al., 2006). Ci siamo chiesti se l'utilizzo del dominante negativo CC-Pax8 ci potesse aiutare ad attribuire a Pax8 un ruolo piu' chiaro nella proliferazione cellulare. Mediante esperimenti di curva di crescita, abbiamo paragonato i parametri proliferativi dei cinque cloni ottenuti con quelli delle cellule PC Cl3 *wild-type*. In particolare, le linee cellulari sono state mantenute per 36 ore in mezzo di coltura senza ormoni e con 0.2% CS senza cambio di mezzo, per ottenere un arresto della crescita. In seguito le cellule sono state mantenute in mezzo di coltura normale (vedi Materiali e Metodi); il mezzo è stato sostituito ogni 24 ore, e le cellule sono state contate ogni 24 ore (con 12 ore di intervallo tra il cambio di mezzo e la conta), il tutto per sei giorni consecutivi. Tale analisi non ha evidenziato differenze significative nei parametri di crescita delle cellule PC Cl3 rispetto ai cinque cloni CCP8 generati (Figura 10A).

Non avendo rilevato parametri significativi che ci facessero ritenere i cloni stabili CCP8 uno strumento utile per studiare il ruolo di Pax8 nella proliferazione delle cellule tiroidee, abbiamo proseguito la caratterizzazione dei suddetti cloni analizzando i parametri caratteristici del fenotipo differenziato tiroideo. In particolare, abbiamo preliminarmente analizzato i cinque cloni CCP8 per l'espressione della Tg endogena, allo scopo di valutare l'effetto dell'espressione del dominante negativo CC-Pax8 sull'espressione di questo caratteristico marcatore del differenziamento tiroide-specifico. L'analisi e' stata effettuata mediante Western blot utilizzando un anticorpo policlonale specifico per la Tg. L'immunorivelazione ha evidenziato una significativa diminuzione

dell'espressione della Tg endogena in tutti e cinque i cloni isolati rispetto alle cellule PC Cl3 *wild-type* (Figura 10B). Pertanto risulta evidente che l'espressione costitutiva della proteina chimerica CC-Pax8 nelle cellule tiroidee differenziate provoca una diminuzione dell'espressione della Tg endogena verosimilmente dovuta all'effetto dominante negativo della chimera esogena sul complesso trascrizionale Pax8/TTF-1. Questo risultato, relativamente atteso essendo ormai noto che Pax8 e TTF-1 sono dei fattori di trascrizione essenziali per l'espressione della Tg (Di Palma et al., 2003), ci ha permesso di identificare il miglior clone su cui effettuare analisi piu' approfondite. Infatti, abbiamo scelto il clone stabile che mostrava la diminuzione di Tg piu' significativa tra i cinque cloni (CCP8-23), sul quale abbiamo condotto ulteriori esperimenti finalizzati ad ottenere un pannello piu' completo del profilo di espressione di altri marcatori del differenziamento tiroideo noti. Mediante esperimenti di *quantitative real-time* RT-PCR (Q-PCR), abbiamo analizzato i livelli di mRNA di diversi marcatori del differenziamento tiroideo. Per ogni campione analizzato e' stato misurato anche il livello di mRNA del gene *housekeeping* α -1 tubulina sul quale e' stata normalizzata la quantita' di cDNA utilizzata come stampo in ogni reazione effettuata. Dopo la normalizzazione, i livelli di mRNA di ogni gene sono stati espressi come percentuale dei livelli misurati nelle cellule PC Cl3 (Figura 11). I risultati di questi esperimenti non solo confermano la marcata riduzione nel clone CCP8-23 dell'espressione del gene *Tg* descritta precedentemente, ma evidenziano anche una significativa diminuzione dell'espressione dei geni *NIS*, *Foxe1*, *ThOX2* e *TTF-1*. Tali esperimenti hanno permesso di osservare anche la riduzione dell'espressione del gene *TSHr*, ma l'analisi statistica, effettuata mediante il test "t di Student" per valutare la significativita' dei risultati ottenuti, ha ridotto l'importanza di tale dato, confermando, invece, l'importanza statistica delle diminuzioni osservate per gli altri geni.

Analisi di *Foxe1*, *ThOX2* e *TTF-1* quali nuovi geni bersaglio di Pax8 e TTF-1

La diminuzione dell'espressione dei geni *Tg* e *NIS* osservata nel clone CCP8-23 e' perfettamente in accordo con precedenti evidenze che descrivono entrambi i

geni come bersagli diretti dell'azione del fattore di trascrizione Pax8 (Pasca di Magliano et al., 2000; Zannini et al., 1992; Fabbro et al., 1998; Ohno et al., 1999; Chun et al., 2001; Taki et al., 2002). Per capire se i geni *Foxe1*, *ThOX2* e *TTF-1* sono geni bersaglio di Pax8 o TTF-1, o di entrambi i fattori, e' stata preliminarmente effettuata un'analisi computazionale attraverso il *Transcription Factor Database* (TRANSFAC pro 9.3; BIOBASE Co.). Abbiamo preso in esame una regione di circa 1000 coppie di basi nella 5'-*flanking region* dei tre geni analizzati, nella quale abbiamo cercato siti di legame per Pax8 e TTF-1. L'analisi ha evidenziato la presenza, nella regione genomica analizzata, di sequenze consenso per entrambi i fattori di trascrizione. Piu' in dettaglio, l'analisi ha permesso di individuare 2 sequenze consenso per Pax8 e 9 per TTF-1 nella 5'-*flanking region* del gene *ThOX2*, 5 sequenze consenso per Pax8 e 3 per TTF-1 nella 5'-*flanking region* del gene *Foxe1* e 3 sequenze consenso per Pax8 e 2 per TTF-1 nella 5'-*flanking region* del gene *TTF-1*.

A) Analisi *in vitro*

Per validare la predizione dell'analisi computazionale, sono stati effettuati saggi EMSA utilizzando oligonucleotidi derivanti dalle suddette sequenze consenso per Pax8 e TTF-1 ed estratto proteico nucleare derivante dalle cellule PC Cl3. I risultati di questi esperimenti hanno rivelato che gli oligonucleotidi derivanti da due delle sequenze consenso per Pax8 individuate nei geni *Foxe1* e *ThOX2*, chiamate rispettivamente *Pax8-binding site 5* (PBS 5) e *Pax8-binding site 8* (PBS 8), sono capaci di formare un complesso proteina-DNA quando incubate con estratto proteico nucleare di cellule PC Cl3 (Figura 12A). Per dimostrare che Pax8 e' effettivamente capace di legare i suddetti siti di legame, sono stati effettuati ulteriori saggi EMSA utilizzando, oltre all' estratto proteico nucleare derivante dalle cellule PC Cl3, anche il *paired domain* di Pax8, espresso e purificato in batteri. Mediante tali esperimenti e' stato dimostrato che sia la sequenza *Pax8-binding site 5* (PBS 5) che la sequenza *Pax8-binding site 8* (PBS 8) sono capaci di formare un complesso proteina-DNA con il *paired domain* di Pax8 (Figura 12A). In parallelo, sono stati effettuati saggi EMSA anche con oligonucleotidi derivanti dalle sequenze consenso per TTF-1 individuate nei geni analizzati. I risultati di tali esperimenti hanno dimostrato che l'oligonucleotide derivante dal sito di legame per TTF-1 individuato nel gene dello stesso TTF-1, chiamato *TTF-1-*

binding site 2 (TBS 2), e' capace di formare un complesso proteina-DNA quando incubata con estratto proteico nucleare di cellule PC Cl3 (Figura 12B). Per dimostrare che TTF-1 e' effettivamente capace di legare il suddetto sito di legame, e' stato effettuato un esperimento di *supershift* utilizzando un anticorpo policlonale specifico per TTF-1. Da tale esperimento risulta evidente che la mobilita' elettroforetica del complesso proteina-DNA osservato con l'oligonucleotide TBS 2 e' chiaramente rallentata dall'anticorpo per TTF-1 (Figura 12B). In tutti i saggi EMSA effettuati, e' stato utilizzato come controllo un oligonucleotide derivante dal promotore della Tg (oligo C) contenente un ben identificato sito di legame sia per Pax8 che per TTF-1 (Zannini et al., 1992). Alla luce di tutti questi esperimenti, e' possibile affermare che Pax8 e' capace di legare *in vitro* la 5'-flanking region dei geni *Foxe1* e *ThOX2*, mentre TTF-1 e' capace di legare *in vitro* la sua stessa 5'-flanking region.

B) Analisi *in vivo*

Per dimostrare la capacita' di Pax8 e TTF-1 di legare le sequenze consenso precedentemente validate *in vitro* anche *in vivo*, sono stati effettuati esperimenti di *Chromatin Immunoprecipitation* (ChIP) su cellule PC Cl3. In tali esperimenti, la cromatina opportunamente fissata e' stata immunoprecipitata utilizzando anticorpi policlonali contro Pax8 e TTF-1. Come controllo, per assicurarsi dell'assenza di un eventuale prodotto di reazione non specifico, e' stata effettuata una reazione non utilizzando l'anticorpo primario e una utilizzando un anticorpo non correlato. La presenza nell'immunoprecipitato delle 5'-flanking regions dei geni *Tg*, *Foxe1* e *TTF-1* e' stata monitorata mediante una reazione di PCR utilizzando oligonucleotidi specifici per le suddette sequenze. Il risultato di questi esperimenti dimostra che, in accordo con i dati ottenuti *in vitro*, sia Pax8 che TTF-1 sono capaci di immunoprecipitare la cromatina contenente il promotore di *Tg* (Figura 13A). Inoltre, l'anticorpo per TTF-1 immunoprecipita la cromatina contenente il TBS 2 localizzato nella sua stessa 5'-flanking region (Figura 13B), mentre l'anticorpo per Pax8 immunoprecipita la cromatina contenente il PBS 8 localizzato nella 5'-flanking region di *Foxe1* (Figura 13C). Sfortunatamente, gli esperimenti di ChIP effettuati per validare *in vivo* il legame di Pax8 alla 5'-flanking region di *ThOX2* osservato *in vitro* necessitano tutt'oggi di

una piu' precisa messa a punto sperimentale, tale da non permetterci di descrivere il dato ottenuto con sufficiente confidenza.

C) Analisi funzionale

Per determinare se i siti di legame per Pax8 e TTF-1 appena identificati nella 5'-*flanking region* di *Foxe1*, *ThOX2* e *TTF-1* fossero effettivamente delle regioni regolatorie della trascrizione dei geni a valle, sono stati condotti esperimenti di transattivazione in cellule HeLa. Innanzitutto sono stati generati dei vettori reporter in cui le sequenze nucleotidiche contenenti i siti di legame per Pax8 e TTF-1 analizzati mediante EMSA e ChIP sono state subclonate a monte del gene della Luciferasi nel vettore pGL3-basic (Promega). Questi vettori reporter, chiamati 5'-*Foxe1*-LUC, 5'-*ThOX2*-LUC e 5'-*TTF-1*-LUC, sono stati trasfettati transientemente in cellula HeLa, in assenza o in presenza di concentrazioni crescenti di vettori di espressione codificanti Pax8 o TTF-1. I risultati di questi esperimenti dimostrano che Pax8 attiva la trascrizione sia dal 5'-*Foxe1*-LUC che dal 5'-*ThOX2*-LUC, mentre TTF-1 attiva la trascrizione dal 5'-*TTF-1*-LUC (Figura 14). Pertanto, questi dati suggeriscono fortemente che *Foxe1*, *ThOX2* e *TTF-1* sono bersagli diretti dell'azione dei due fattori di trascrizione Pax8 e TTF-1.

DISCUSSIONE

Mediante questo lavoro di tesi abbiamo proposto l'utilizzo dell' "*Oligomerization Chain Reaction*" (OCR) quale efficiente strategia per ottenere l'inattivazione funzionale del fattore trascrizionale Pax8 e dell'eterocomplesso Pax8/TTF-1 in cellule tiroidee. Diversi studi hanno indicato Pax8 come un gene *master* per il mantenimento del fenotipo tiroideo differenziato; infatti la sua presenza e' necessaria per l'attivazione trascrizionale di tutti i marcatori del differenziamento come la tireoglobulina, la tireoperossidasi e la pompa sodio/iodio (Pasca di Magliano et al., 2000). Inoltre, l'analisi del fenotipo dei topi *knock-out* per Pax8 (Mansouri et al., 1998) e TTF-1 (Kimura et al., 1996) e l'esempio di pazienti affetti da ipotiroidismo congenito (Macchia et al., 1998; Macchia et al., 1999; Vilain et al., 2001; Congdon et al., 2001; Komatsu et al., 2001) o da disfunzioni tiroidee (Devriendt et al., 1998; Iwatani et al., 2000) hanno confermato l'importanza di entrambi i fattori per la morfogenesi e per il corretto funzionamento della ghiandola. Recentemente, il nostro laboratorio ha dimostrato che Pax8 e TTF-1 sono capaci di interagire direttamente *in vitro* e di formare un complesso funzionale *in vivo* responsabile di un'attivazione trascrizionale sinergica del promotore *Tg* (Di Palma et al., 2003). L'appartenenza di Pax8 al suddetto complesso funzionale ha reso tale proteina un possibile candidato per l'utilizzo della OCR. Questa tecnica innovativa si basa sulla fusione del "*self-associating coiled-coil domain*" (CC) del fattore nucleare "*Promyelocytic leukemia*" (PML) ad una proteina bersaglio capace di auto-associarsi (Contegno et al., 2002) o di formare etero-complessi (Napolitano et al., 2003). La fusione del dominio CC alla proteina bersaglio porta alla formazione di macro-complessi ad alto peso molecolare che risultano funzionalmente inattivi. Mediante studi non descritti in questo elaborato di tesi, abbiamo dimostrato che Pax8 non e' una proteina capace di formare omo-complessi ma, essendo in grado di interagire con TTF-1 e dando luogo alla formazione di un etero-complesso funzionalmente attivo, ci e' apparso ugualmente una possibile proteina bersaglio della OCR. I risultati da noi ottenuti avvalorano la nostra ipotesi e dimostrano

che la fusione del dominio CC di PML alla proteina Pax8 genera una OCR responsabile dell'alterazione delle proprietà funzionali della stessa proteina Pax8 e del complesso Pax8/TTF-1. Considerando l'incapacità di Pax8 di formare omo-complessi, l'effetto dominante-negativo esercitato dalla proteina chimerica CC-Pax8 sulla proteina Pax8 *wildtype* non è di facile interpretazione e necessita di ulteriori indagini. L'osservata alterazione funzionale indotta dalla proteina CC-Pax8 sul fattore di trascrizione TTF-1 e sul complesso Pax8/TTF-1 è conseguente alla mantenuta capacità di interazione biochimica osservata tra la proteina CC-Pax8 e TTF-1, ed è assolutamente coerente con il modello molecolare proposto in letteratura alla base dell'oligomerizzazione scatenata dalla presenza del dominio CC nella proteina chimerica. Infatti, la fusione del suddetto dominio proteico a Pax8 induce la formazione di complessi proteici aberranti ad alto peso molecolare, nei quali è sequestrato anche TTF-1, che verosimilmente sono generati dalla descritta capacità di trimerizzare del dominio CC di PML (Contegno et al., 2002). I suddetti aggregati proteici manifestano una localizzazione extra-nucleare, la quale risulta del tutto anomala per i fattori di trascrizione Pax8 e TTF-1 e giustifica la loro inattivazione funzionale derivante dalla conseguente impossibilità delle due proteine a legare il DNA.

L'analisi di cellule tiroidee differenziate PC Cl3 esprimenti stabilmente la proteina chimerica CC-Pax8 ha fornito risultati molto interessanti. Infatti l'espressione stabile della proteina chimerica CC-Pax8 in cellule tiroidee differenziate ha provocato una specifica interferenza con la trascrizione di geni bersaglio di Pax8 e TTF-1 in un contesto cromosomico fisiologico, permettendoci di identificare i geni *Foxe1*, *ThOX2* e *TTF-1* quali potenziali bersagli della regolazione trascrizionale mediata dai due fattori. Alla luce di quanto attualmente è noto sul ruolo di questi due fattori di trascrizione nella regolazione dell'espressione genica tiroide-specifica, il risultato da noi ottenuto appare estremamente promettente.

Pax8 appartiene ad una famiglia di nove geni codificanti per fattori di trascrizione essenziali per l'organogenesi e il differenziamento di diversi organi (Mansouri et al., 1996; Dahl et al., 1997; Mansouri et al., 1999; Stuart et al., 1996). In particolare, l'analisi di topi transgenici e topi *Pax8*^{-/-} ha evidenziato un ruolo

chiave di Pax8 nello sviluppo e nel differenziamento della ghiandola tiroidea (Mansouri et al., 1998), e, in aggiunta, pazienti affetti da ipotiroidismo congenito presentano mutazioni nel gene *Pax8* (Macchia et al., 1998). Tuttavia, fino ad ora si sa poco sui bersagli *in vivo* del fattore di trascrizione Pax8. E' stato dimostrato che Pax8 e' necessario per l'espressione di *Tg*, *TPO* e *NIS*, tutti geni considerati marcatori del fenotipo tiroideo differenziato (Pasca di Magliano et al., 2000). Purtroppo, l'evidenza che i topi *Pax8*^{-/-} mancano di cellule follicolari tiroidee (Mansouri et al., 1998), sebbene suggerisca un ruolo essenziale di questo gene nell'organogenesi tiroidea, non contribuisce a chiarire ulteriormente il ruolo di Pax8 nel controllo del fenotipo tiroideo differenziato poiche' i precursori delle cellule tiroidee scompaiono prima dell'accensione dell'espressione genica dei marcatori del differenziamento. Inoltre, la presenza di mutazioni nel gene *Pax8* in individui che manifestano disgenesia tiroidea (Macchia et al., 1998) sottolinea indubbiamente un ruolo importante di questa proteina durante l'organogenesi della ghiandola tiroidea ma non contribuisce alla comprensione del suo coinvolgimento nell'espressione di geni tiroide-specifici.

Analoghe considerazioni possono essere fatte per il fattore di trascrizione TTF-1. L'analisi di topi *knockout* rivela che TTF-1 e' un fattore essenziale per la sopravvivenza dei precursori delle cellule tiroidee, sebbene non sia richiesto per la loro iniziale formazione, ma non fornisce un mezzo utile per comprendere in maniera piu' dettagliata il suo coinvolgimento nell'espressione genica tiroide-specifica (Kimura et al., 1996; Kimura et al., 1999; Parlato et al., 2004).

I risultati ottenuti nel corso di questo progetto di tesi permettono di aggiungere nuove informazioni sul ruolo di Pax8 e TTF-1 nel differenziamento tiroideo. Infatti, l'inattivazione funzionale di questi due fattori trascrizionali mediante la metodica dell'OCR ha generato una diminuzione dell'espressione di marcatori del differenziamento tiroideo quali *Tg*, *NIS*, *ThOX2*, *Foxe1* e *TTF-1*.

Poiche' *Tg* e *NIS* sono due noti geni bersaglio di Pax8 e TTF-1 (Pasca di Magliano et al., 2000; Zannini et al., 1992; Ohno et al., 1999; Chun et al., 2001), la *down-regulation* della loro espressione da noi osservata e' totalmente in accordo con le gia' note evidenze sperimentali. Nonostante cio', i nostri esperimenti di ChIP apportano ugualmente una novita' in quanto forniscono la prima evidenza di un legame *in vivo* di Pax8 e TTF-1 al promotore del gene *Tg*, per quanto tali

interazioni DNA/proteina e gli effetti funzionali delle stesse fossero stati esaustivamente indagati *in vitro*.

ThOX2 e' un gene tiroide-specifico clonato di recente (De Deken et al., 2000) che codifica per una flavoproteina Ca^{2+} -dipendente con attivita' NADPH-ossidastica. La proteina *ThOX2* co-localizza con la TPO sulla membrana apicale delle cellule tiroidee e rappresenta il sistema tiroideo adibito alla generazione dell' H_2O_2 . L'espressione di questo sistema e' stimolata dalla via del cAMP attraverso il recettore del TSH, e la sua attivita' enzimatica e' regolata dalla cascata del Ca^{2+} -fosfatidilinositolo (Raspe et al., 1995). I risultati dei nostri esperimenti dimostrano che l'espressione di *ThOX2* e' sotto il controllo del fattore di trascrizione Pax8. Infatti, abbiamo identificato un sito di legame per Pax8 nella *5'-flanking region* del gene *ThOX2*, validando l'effettivo legame di Pax8 a tale sito e la sua capacita' di attivare la trascrizione a partire da una regione genomica contenente la sequenza identificata. Alla luce di quanto e' riportato in letteratura, questa da noi dimostrata e' la prima evidenza sperimentale che descrive *ThOX2* come un bersaglio trascrizionale di Pax8.

Foxe1 e' un membro della famiglia di proteine *forkhead*. Recentemente e' stato pubblicato un lavoro in cui gli autori descrivono una significativa diminuzione dei livelli di espressione della proteina Foxe1 in topi *Pax8*^{-/-} (Parlato et al., 2004). I nostri dati sostengono il suddetto lavoro e propongono un'evidenza diretta sulla regolazione dell'espressione di Foxe1 da parte di Pax8. Infatti, i nostri esperimenti dimostrano che Pax8 e' capace di legare, *in vitro* e *in vivo*, una sequenza presente nella *5'-flanking region* del gene *Foxe1*, attivandone conseguenzialmente la trascrizione.

L'ultima evidenza da noi ottenuta dimostra che TTF-1 lega, sia *in vitro* che *in vivo*, una sequenza presente nella sua stessa *5'-flanking region*, attivando la trascrizione genica a partire da questa regione. Questo risultato suggerisce che l'espressione di TTF-1 e' controllata da un meccanismo di autoregolazione mediata dal legame del fattore di trascrizione alla sua stessa *5'-flanking region*. La nostra osservazione e' supportata da un precedente lavoro in cui gli autori descrivono una possibile autoregolazione di TTF-1 (Nakazato et al., 1997).

Concludendo, possiamo affermare che la metodica dell'OCR si e' rivelata una efficiente strategia per generare un dominante-negativo del fattore di trascrizione

Pax8. Mediante l'espressione di questo dominante-negativo siamo riusciti ad interferire sull'attività funzionale dello stesso Pax8 e su quella del suo principale interattore TTF-1 identificando nuovi geni bersaglio dell'azione regolatoria di questi due fattori di trascrizione. In realtà, per quanto estremamente promettenti, i nostri dati costituiscono una buona base di partenza su cui pianificare ulteriori indagini volte ad una più completa comprensione della complessa rete di regolazioni alla base della determinazione e del mantenimento del fenotipo tiroideo differenziato. Attualmente, risulta sempre più convincente il legame esistente tra la perdita del differenziamento e la trasformazione nelle cellule tiroidee. Pertanto, è evidente che una completa conoscenza della funzione di ogni singola molecola coinvolta nella regolazione del differenziamento cellulare rappresenta un traguardo importante per la comprensione dei processi fisiologici e patologici a carico della ghiandola tiroidea.

MATERIALI E METODI

Plasmidi

Il costrutto codificante la proteina di fusione 3XFLAG-CC-Pax8 e' stato generato nel seguente modo: il cDNA corrispondente al dominio CC di PML (codificante gli amminoacidi 200-339 della proteina PML) e' stato amplificato mediante PCR usando il cDNA di PML come template, e successivamente subclonato tra i siti *HindIII* e *BglII* del vettore di espressione 3XFLAG-CMV10 (SIGMA). Il cDNA di Pax8 e' stato amplificato mediante PCR utilizzando oligonucleotidi aventi alle loro estremita' i siti *BglII* e *XbaI*, e successivamente subclonato nei corrispondenti siti del vettore di espressione 3XFLAG-CMV10 (SIGMA) a valle della sequenza del dominio CC. Per generare i plasmidi pCC-Pax8-EYFP e pPax8-EYFP, gli inserti sono stati amplificati mediante PCR utilizzando oligonucleotidi aventi alle loro estremita' il sito *HindIII*, e successivamente subclonati nel vettore di espressione pEYFP-N1 (CLONTECH). I frammenti di DNA contenenti il Pax8-binding site-8, Pax8-binding site-5 e il TTF-1-binding site-2 sono stati amplificati mediante PCR utilizzando DNA genomico di ratto come template e oligonucleotidi aventi alle loro estremita' i siti *KpnI* e *BglII*. I frammenti sono stati subclonati nei corrispondenti siti del plasmide pGL3-basic (Promega), e i costrutti cosi' generati sono stati chiamati 5'-Foxe1-LUC, 5'-ThOX2-LUC e 5'-TTF-1-LUC. Tutti i costrutti generati sono stati verificati mediante sequenza.

I plasmidi usati nelle trasfezioni transienti sono stati descritti precedentemente e sono i seguenti: Tg-CAT (pTACAT3) (Sinclair et al., 1990); CMV-TTF-1 (Guazzi et al., 1990); CP5-CAT (Missero et al., 1998); C5-CAT (De Felice et al., 1995).

I plasmidi CMV-CAT e CMV-LUC sono usati come controlli interni negli esperimenti di trasfezione. Il DNA di tutti i plasmidi e' stato preparato utilizzando il Kit di maxipreparazione di DNA Qiagen (Qiagen GmbH, Germania).

Culture cellulari, trasfezioni e saggi di proliferazione cellulare.

Le linee cellulari HeLa e PC Cl3 sono già state descritte precedentemente (Berlingieri et al., 1988).

Le cellule PC Cl3 sono state cresciute nel mezzo F12 Coon's modificato (Euroclone) in presenza di 5% siero (Euroclone), sei ormoni e fattori di crescita come descritto da Ambesi-Impiombato e Coon (Ambesi Impiombato and Coon 1979).

Le cellule HeLa sono state cresciute in DMEM (Euroclone) con aggiunta di 10% siero fetale. Per gli esperimenti di trans-attivazione, le cellule sono state piastrate alla densità di 3×10^5 cellule/60-mm, 5-8 ore prima della trasfezione. Tutte le trasfezioni sono state eseguite con il Fugene 6 (Roche Diagnostic) secondo il protocollo consigliato dalla ditta. In tutti gli esperimenti è stato usato un rapporto DNA/Fugene di 1/2.

Gli estratti cellulari sono stati preparati, seguendo il protocollo di seguito descritto, 48 ore dopo la trasfezione e sono stati utilizzati per determinare sia i livelli della proteina CAT mediante il Kit CAT ELISA (Roche Diagnostic) che le attività della proteina LUC come precedentemente descritto (Zannini et al., 1997).

Gli esperimenti di trasfezione transiente sono stati fatti in duplicato e ripetuti tre volte.

Per i saggi di trasfezione stabile le cellule PC Cl3 sono state piastrate alla densità di 6×10^5 cellule/100-mm, 24 ore prima della trasfezione. Dopo 48 ore dalla trasfezione sono state messe in selezione con 0.4mg/ml di G418 (Invitrogen) e sono state mantenute sotto selezione fino alla comparsa di cloni. I diversi cloni ottenuti, sono stati cresciuti e tra essi sono stati identificati quelli che esprimevano stabilmente la proteina 3XFLAG-CC-Pax8.

Per misurare i parametri di crescita, le cellule PC Cl3 e i cloni CCP8 sono stati piastrati ad una densità di 1×10^4 cellule/60-mm. Le cellule sono state mantenute in mezzo F12 con il 5% di siero, sei ormoni e fattori di crescita, come descritto precedentemente. Il mezzo è stato cambiato ogni 24 ore dopo le quali le cellule sono state raccolte e contate.

Estratti cellulari

Per i saggi enzimatici LUC e CAT le cellule HeLa, transientemente trasfettate, sono state lavate con PBS 1X, raccolte in 0.5 ml del tampone TEN (40 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 150 mM NaCl) e centrifugate a 6000 rpm per 5 minuti nella microcentrifuga. Il sedimento e' stato sottoposto a due cicli di congelamento/scongelo prima di essere risospeso in 100 μ l del tampone di lisi (10 mM Hepes pH 7,9, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 5% glicerolo, 0,5 mM PMSF, 400 mM NaCl). Il lisato proteico e' stato chiarificato mediante centrifugazione per 30 minuti a 14000 rpm nella microcentrifuga.

Per gli esperimenti di co-immunoprecipitazione le cellule HeLa transientemente trasfettate sono state lavate e raccolte in PBS 1X, e centrifugate a 6000 rpm per 5 minuti nella microcentrifuga. Il pellet e' stato risospeso in 100 μ l/100-mm di buffer EBC [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 10% glicerolo, inibitori di proteasi e fosfatasi (SIGMA)]. Il lisato proteico e' stato chiarificato mediante centrifugazione per 30 minuti a 14000 rpm nella microcentrifuga. La determinazione della concentrazione proteica degli estratti è stata eseguita mediante il saggio Bradford (BIORAD).

Immunoprecipitazione

Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione sono stati condotti, incubando 2mg di estratto totale preparato nel buffer EBC [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 10% glicerolo, inibitori di proteasi e fosfatasi (SIGMA)] con 20 μ l di resina anti-FLAG agarosio affinity gel (SIGMA), precedentemente equilibrata nello stesso buffer, a 4 °C in agitazione per 16h-18h. I campioni sono stati centrifugati a 2200rpm per 5 minuti a 4°C nella microcentrifuga e dopo cinque lavaggi con il buffer EBC le proteine sono state eluite nel sample buffer 2X SDS-PAGE e denaturate a 95 °C per 5 minuti, prima di essere caricate sul gel.

Anticorpi e Immunoblot.

Gli anticorpi contro le proteine TTF-1 e Tg sono stati purificati nel laboratorio del prof. Di Lauro e sono stati diluiti entrambi 1/1000, rispettivamente in una soluzione di BSA allo 0.5% e in una di latte al 5% in TTBS 1X (200mM Tris HCl, pH 7.5, 9% NaCl), contenente 0.05% Tween 20. Gli anticorpi anti-FLAG-M2 e anti-tubulina (SIGMA) sono stati diluiti 1/5000 in una soluzione al 5% latte in TTBS 1X, contenente 0.05% Tween 20. L'anticorpo anti-Sp1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) e' stato diluito 1/500 in una soluzione al 5% BSA in TTBS 1X, contenente 0.05% Tween 20. Dopo la separazione mediante corsa elettroforetica su SDS-PAGE le proteine sono state trasferite su membrane di Immobilon-P (Millipore, Germany) per 16-18 ore. I *blots* sono stati sottoposti a successivi trattamenti prima con gli appropriati anticorpi primari e poi con gli anticorpi secondari coniugati alla perossidasi, i quali hanno permesso d'immunorivelare le proteine mediante chemiluminescenza (ECL Kit; Amersham, Biosciences).

Cromatografia ad esclusione molecolare

2 mg di estratto totale, preparato nel buffer EBC [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 10% glicerolo, inibitori di proteasi e fosfatasi (SIGMA)], e' stato caricato sulla colonna Sepharose 6HR (Amersham Biosciences), equilibrata nel buffer A (0.1M sodio fosfato, pH 7.2, 150mM NaCl). La colonna e' stata corsa nel buffer A a 0.3 ml/min e gli eluati sono stati raccolti in frazioni di 0.3 ml. Le frazioni sono state precipitate con 25% acido tricloroacetico, prima di essere caricate su SDS-PAGE.

Immunofluorescenza e microscopia confocale

Le cellule sono state piastrate e trasfettate direttamente su vetrino e dopo 48h sono state fissate in una soluzione di formaldeide al 4% in PBS 1X per 20 minuti a temperatura ambiente. Poi sono state permeabilizzate per 7 minuti in 0.1% Triton

X-100 in PBS 1X e incubate per 10 minuti in 0.1M glicina in PBS 1X. In seguito sono state incubate per 1h con l'anticorpo primario anti-TTF-1 (Lazzaro et al., 1991) diluito 1:100 in una soluzione di BSA 0.5% in PBS 1X e, dopo lavaggi in PBS, incubate per 20 minuti con un anticorpo secondario marcato con rodamina (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluito 1:50 in una soluzione 0.5% di BSA in PBS 1X. Dopo i lavaggi in PBS 1X i vetrini sono stati montati su un copri-oggetto, utilizzando una soluzione di glicerolo al 70% in PBS 1X.

Le immagini sono state acquisite con il microscopio confocale Zeiss LSM 510, munito di un laser ad argon di 488 nm, di un laser ad HeNe di 543nm e di un obiettivo ad immersione ad olio di 63X1.4. La fluorescenza emessa e' stata rivelata, usando un filtro di BP 505-530 per la EYFP ed un filtro LP 560 per i segnali TRITC. Le immagini sovrapposte sono state rivelate simultaneamente nei canali del verde e del rosso.

Estrazione di RNA, sintesi del cDNA e Q-PCR

L'RNA totale e' stato preparato mediante estrazione con TRIZOL (Invitrogen) secondo il protocollo consigliato dalla ditta. 4 µg di RNA totale e' stato retrotrascritto utilizzando il Superscript First Strand Synthesis System per RT PCR (Invitrogen) secondo il protocollo consigliato dalla ditta. Gli esperimenti di Real-time PCR (Q-PCR) sono stati effettuati utilizzando il sistema ABI Prism 7900HT e la metodologia chimica del SYBR green (PE Applied Biosystems). Le reazioni sono state condotte in triplicato usando, per ogni reazione, la quantita' di cDNA ottenuta da 130 ng di RNA totale e oligonucleotidi alla concentrazione di 0.3 µM. Gli oligonucleotidi utilizzati per gli esperimenti sono stati gia' descritti precedentemente (De Vita et al., 2005)

ChIP

La soluzione di fissaggio, contenente l'1% di formaldeide, e' stata aggiunta direttamente al mezzo di coltura. Le cellule sono state fissate per 10 minuti, dopo i quali la reazione e' stata bloccata aggiungendo glicina ad una concentrazione di 125 mM. Le cellule PC Cl3 sono state lavate due volte con PBS freddo contenente 1 mM PMSF e quindi raccolte. Le cellule sono state centrifugate a 800 X g per 5 minuti a 4 °C nella microcentrifuga. Il sedimento e' stato risospeso in buffer di lisi freddo contenente 5mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM PMSF e inibitori di proteasi (SIGMA) e incubato in ghiaccio per 10 minuti. I campioni sono stati sottoposti a sonicazione per ottenere frammenti di cromatina di lunghezza media di 500/1000 coppie di basi e quindi centrifugati a 16.000 X g. Il sovrnatante delle cellule sonicate e' stato diluito di un fattore di diluizione 8 in un buffer contenente 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1) e 167 mM NaCl, e incubato con Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose (Upstate Biotechnology) per 30 minuti a 4 °C. La cromatina derivante da 1×10^6 cellule cosi' trattata e' stata incubata in rotazione con 1 µg di anticorpo policlonale (anti-Pax8, anti-TTF-1 o un anticorpo non-specifico), o con nessun anticorpo per 16 ore a 4 °C. Gli immunoprecipitati sono stati lavati 5 volte con buffer RIPA [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deossicolato, 0.1% SDS, 140 mM NaCl, 1 mM PMSF], due volte con buffer LiCl [0.25 mM LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% Na-deossicolato, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8)], e tre volte con TE [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA]. Prima del primo lavaggio il surnatante della reazione senza l'anticorpo primario e' stato conservato quale input totale della cromatina ed e' stato processato con gli eluati degli immunoprecipitati per il passaggio inverso di fissazione. Gli immunoprecipitati sono stati eluiti aggiungendo 1% SDS e 0.1 M NaHCO_3 e sottoposti a fissazione inversa mediante aggiunta di NaCl ad una concentrazione finale di 200 mM e mediante riscaldamento a 65 °C per 16 ore. Il materiale recuperato e' stato trattato con proteinasi K, estratto con fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (25:24:1) e precipitato. I sedimenti sono stati risospesi in 30 µl di TE e analizzati mediante

PCR utilizzando oligonucleotidi specifici per le regioni analizzate. Gli input sono stati risospesi in 30 µl di TE e diluiti 1:10 prima della PCR.

EMSA

Oligonucleotidi a doppio filamento sono stati marcati con γ -³²P ATP e l'enzima T₄ polinucleotide chinasi e utilizzati come probes. Le reazioni di legame sono state condotte in un buffer contenente 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 75 mM KCl, 1 mM DTT, 10% glicerolo, 1 mg/ml BSA e 3 mg/ml poly(dI-dC). Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, il DNA libero e i complessi DNA-proteina sono stati risolti su un gel non denaturante di poliacrilammide al 5% e visualizzati con un Phosphorimager (Molecular Dynamics). L'anticorpo utilizzato negli esperimenti di supershift e' stato incubato con l'estratto proteico per 20 minuti prima di aggiungere il probe. Per gli esperimenti effettuati con la proteina purificata il buffer di incubazione delle reazioni contiene 1/3 della quantita' di poly(dI-dC), pari a 1 mg/ml.

Oligonucleotidi

Gli oligonucleotidi sintetici impiegati in questo lavoro di tesi sono stati sia preparati con un apparato Beckmann SM-DNA Synthesiser dal Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica "Anton Dohrn" di Napoli che acquistati dalla PRIMM.

Le sequenze sono state eseguite dal Servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica "Anton Dohrn" di Napoli.

BIBLIOGRAFIA

- Ambesi-Impiombato, F. S., and Coon, H. G. (1979) Thyroid cells in culture *Int. Rev. Cytol.* **10**:163-172.
- Au, A.Y., McBride, C., Wihelm Jr, K.G., Koenig, R.J., Speller, B., Cheung, L., Messina, M., Wentworth, J., Tasevski, V., Learoyd, D., Robinson, B.G., Clifton-Bligh, R.J. (2006) Pax8-peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) distrupts normal Pax8 or PPAR γ transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth. *Endocrinology* **147**:367-376
- Bachiller, D., Mascias, A., Dubouble, D. and Morata, G. (1994) Conservation of a functional hierarchy between mammalian and insect Hox/HOM genes. *Embo J*, **13**, 1930-41.
- Bedford, F. K., Ashworth, A., Enver, T., and Wiedemann, L. M. (1993) HEX: a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human *Nucleic Acids Res* **21**:1245-1249.
- Berlingieri, M., Portella, G., Grieco, M., Santoro, M., and Fusco, A. (1988) Cooperation between the polyomavirus middle-T-antigen gene and the human c-myc oncogene in a rat thyroid epithelial differentiated cell line: model of in vitro progression *Mol. Cell. Biol.* **8**:2261-2266.
- Bogue, C. W., Ganea, G. R., Sturm, E., Ianucci, R., and Jacobs, H. C. (2000) Hex expression suggests a role in the development and function of organs derived from foregut endoderm *Dev. Dyn.* **219**:84-89.
- Bohinski, R. J., Di Lauro, R., and Whitsett, J. A. (1994) The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis *Mol. Cell. Biol.* **14**:5671-5681.
- Bruno, M. D., Bohinski, R. J., Huelsman, K. M., Whitsett, J. A., and Korfhagen, T. R. (1995) Lung cell-specific expression of the murine surfactant protein A (SP-A) gene is mediated by interactions between the

SP-A promoter and thyroid transcription factor-1 *J. Biol. Chem.* **270**:6531-6536.

- Chun, J.T., Di Lauro R. (2001) Characterization of the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109**:23-26
- Chun, J. T., Di Dato, V., D'Andrea, B., Zannini, M., and Di Lauro, R. (2004) The CRE-Like Element Inside the 5'-Upstream region of the Rat Sodium/Iodide Symporter Gene interacts with Diverse Classes of b-Zip Molecules that Regulate Transcriptional Activities through Strong Synergy with Pax-8 *Mol. Endocrin.* **18**:2817-2829.
- Civitareale, D., Lonigro, R., Sinclair, A. J., and Di Lauro, R. (1989) A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter *EMBO J.* **8**:2537-2542.
- Congdon, T., Nguyen, L. Q., Nogueira, C. R., Habiby, R. L., Medeiros-Neto, G., and Kopp, P. (2001) A novel mutation (Q40P) in Pax8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**:3962-3967.
- Contegno, F., Cioce, M., Pelicci, P.G., Minucci, S. 2002 Targeting protein inactivation through an oligomerization chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1865-9
- Crompton, M. R., Bartlett, T. J., MacGregor, A. D., Manfioletti, G., Buratti, E., Giancotti, V., and Goodwin, G. H. (1992) Identification of a novel vertebrate homeobox gene expressed in haematopoietic cells *Nucleic Acids Res* **20**:5661-5667.
- Dahl E, Koseki H, Balling R 1997 Pax genes and organogenesis. *Bioessays* **19**:755-65
- Damante, G. and Di Lauro, R. (1994) Thyroid-specific gene expression *Biochim. Biophys. Acta* **1218**:255-266.
- Damante, G., Tell, G., and Di Lauro, R. (2001) A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **66**:307-356.

- De Deken, X., Wang, D., Many, MC., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, JE., Miot, F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* **275**:23227-23233
- De Felice, M., Damante, G., Zannini, M., Francis-Lang, H., and Di Lauro, R. (1995) Redundant domains contribute to the transcriptional activity of the thyroid transcription factor 1 *J. Biol. Chem.* **270**:26649-26656.
- De Felice, M., Ovitt, C., Biffali, E., Rodriguez-Mallon, A., Arra, C., Anastassiadis, K., Macchia, P. E., Mattei, M. G., Mariano, A., Schoeler, H., Macchia, V., and Di Lauro, R. (1998) A mouse model for Hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate *Nat. Genet.* **19**: 395-398.
- De Felice, M., and Di Lauro, R. (2004) Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms *Endocr. Rev.* **25**:722-746.
- De Vita, G., Bauer, L., da Costa, V.M., De Felice, M., Baratta, M.G., De Menna, M., Di Lauro, R. 2005 Dose-dependent inhibition of thyroid differentiation by RAS oncogenes. *Mol Endocrinol* **19**:76-89
- Devriendt, K., Vanhole, C., Matthijs, G., and De Zegher, F. (1998) Deletion of Thyroid Transcription Factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure *N Engl J Med* **338**:1317-1318.
- Di Palma, T., Nitsch, R., Mascia, A., Nitsch, L., Di Lauro, R., Zannini, M. 2003 The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* **278**:3395-402
- Dorfler, P., and Busslinger, M. (1996) C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (Pax-5), Pax-2 and Pax-8 *EMBO J.* **15**:1971-1982.
- Espinoza, C. R., Schmitt, T. L., e Loos, U. (2001) Transcriptional regulation of the human sodium/iodide symporter gene by Pax8 and TTF-1 *J. Mol.Endocrinol.* **27**:59-65.

- Fabbro, D., Pellizzari, L., Mercuri, F., Tell, G., Damante, G. (1998) Pax-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expression *J. Mol. Endocrinol.* **21**:347-354.
- Francis-Lang, H., Price, M., Polycarpou-Schwarz, M., e Di lauro, R. (1992) Cell-type-specific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression *Mol. Cell. Biol.* **12**:576-588.
- Gruss, P. and Walther, C. (1992) Pax in development. *Cell* **69**:719-722.
- Guazzi, S., Price, M., De Felice, M., Damante, G., Mattei, M. G. and Di Lauro, R. (1990) Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity *Embo J.* **9**:3631-3639.
- Iwatani, N., Mabe, H., Devriendt, K., Kodama, M., Miike, T. (2000) Deletion of NKX2.1 gene encoding thyroid transcription factor-1 in two siblings with hypothyroidism and respiratory failure *J. Pediatr.* **137**:272-276.
- Kanai, F., Marignani, P. A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R.A., Donowitz, M., Hisaminato, A., Fujiwara, T., Ito, Y., Cantley, L. C., Yaffe, M.B. (2000) TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins *EMBO J.* **19**:6778-6791.
- Kelly, S. E., Bachurski, C. J., Burhans, M. S., Glasser, S. W. (1996) Transcription of the lung-specific surfactant protein C gene is mediated by thyroid transcription factor 1 *J. Biol. Chem.* **271**:6881-6888.
- Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C. H., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J. (1996) The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary *Genes Dev.* **10**:60-69.
- Kimura, S., Ward J. M., Minoo, P. (1999) Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia *Biochimie* **81**:321-327.

- Komatsu, M., Takahashi, T., Takahashi, I., Nakamura, M., Takahashi, I., Takada, G. (2001) Thyroid dysgenesis caused by PAX8 mutation: the hypermutability with CpG dinucleotides at codon 31 *J. Pediatr.* **139**:597-599.
- Lazzaro, D., Price, M., De Felice, M. and Di Lauro, R. (1991) The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* **113**:1093-1104.
- Lin, R.J., Evans, R.M. 2000 Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Mol Cell* **5**:821-30
- Liu, C., Glasser, S. W., Wan, H., Whitsett, J. A. (2002) GATA-6 and thyroid transcription factor-1 directly interact and regulate surfactant protein-C gene expression *J. Biol. Chem.* **277**:4519-4525.
- Macchia, P. E., Lapi, P., Krude, H., Pirro, M. T., Missero, C., Chiovato, L., Souabni, A., Baserga, M., Tassi, V., Pinchera, A., Fenzi, G., Gruters, A., Busslinger, M., Di Lauro, R. (1998) PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis *Nat. Genet.* **19**:83-86.
- Macchia, P.E., De Felice, M. and Di Lauro, R. (1999) Molecular genetics of congenital hypothyroidism *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**:289-294.
- Mansouri, A., Chowdhury, K. and Gruss, P. (1998) Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function *Nat. Genet.* **19**:87-90.
- Mansouri, A., Goudreau, G., Gruss, P. 1999 Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer Res* **59**:1707s-1709s; discussion 1709s-1710s
- Mansouri, A., Hallonet, M., Gruss, P. 1996 Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol* **8**:851-7
- Martinez Barbera, J. P., Clements, M., Thomas, P., Rodriguez, T., Meloy, D., Kioussis, D., Beddington, R. S. (2000) The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation *Development* **127**:2433-2445.

- Mascia, A., Nitsch, L., Di Lauro, R., Zannini, M. (2002) Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells *J. Endocrinol.* **172**:163-176.
- Mauchamp, J., Mirrione, A., Alquier, C., Andre, F. (1998) Follicle-like structure and polarized monolayer: role of the extracellular matrix on thyroid cell organization in primary culture *Biol. Cell.* **90**:369-380.
- Miccadei, S., De Leo, R., Zammarchi, E., Natali, P. G., e Civitareale, D. (2002) The synergistic activity of thyroid transcription factor 1 and Pax 8 relies on the promoter/enhancer interplay *Mol. Endocrinol.* **16**:837-846.
- Minucci, S., Maccarana, M., Cioce, M., De Luca, P., Gelmetti, V., Segalla, S., Di Croce, L., Giavara, S., Matteucci, C., Gobbi, A., Bianchini, A., Colombo, E., Schiavoni, I., Badaracco, G., Hu, X., Lazar, M.A., Landsberger, N., Nervi, C., Pelicci, P.G. 2000 Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. *Mol Cell* **5**:811-20
- Missero, C., Cobellis, G., De Felice, M., Di Lauro, R. 1998 Molecular events involved in differentiation of thyroid follicular cells. *Mol Cell Endocrinol* **140**:37-43
- Mizuno, K., Gonzalez, F. J., Kimura, S. (1991) Thyroid-specific enhancer-binding protein (T/EBP): cDNA cloning, functional characterization, and structural identity with thyroid transcription factor TTF-1 *Mol. Cell. Biol.* **11**:4927-4933.
- Muratovska, A., Zhou, C., He, S., Goodyer, P., Eccles, M.R. (2003) Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene* **22**:7989-7997.
- Nakazato, M., Endo, T., Saito, T., Harii, N., Onaya, T. (1997) Transcription of the thyroid transcription factor-1 (TTF-1) gene from a newly defined start site: positive regulation by TTF-1 in the thyroid. *Biochem Biophys Res Commun* **238**:748-752.
- Napolitano, G., Mazzocco, A., Fraldi, A., Majello, B., Lania, L. 2003 Functional inactivation of Cdk9 through oligomerization chain reaction. *Oncogene* **22**:4882-8

- Ohmori, M., Shimura, H., Shimura, Y., Ikuyama, S. and Kohn, L.D. (1995) Characterization of an up-stream thyroid transcription factor-1-binding site in the thyrotropin receptor promoter *Endocrinology* **136**:269-282.
- Ohmori, M., Endo, T., Harii, N. and Onaya, T. (1998) A novel thyroid transcription factor is essential for thyrotropin- induced up-regulation of Na⁺/I⁻ symporter gene expression *Mol. Endocrinol.* **12**:727-736.
- Ohno, M., Zannini, M., Levy, O., Carrasco, N. and di Lauro, R. (1999) The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription *Mol. Cell. Biol.* **19**:2051-2060.
- Park, K. S., Whitsett, J. A., Di Palma, T., Hong, J. H., Yaffe, M. B., Zannini, M. (2004) TAZ interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-C *J. Biol. Chem.* **279**:17384-17390.
- Parlato, R., Rosica, A., Rodriguez-Mallon, A., Affuso, A., Postiglione, M.P., Arra, C., Mansouri, A., Kimura, S., Di Lauro, R., De Felice, M. 2004 An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol* **276**:464-75
- Pasca di Magliano, M., Di Lauro, R. and Zannini, M. (2000) Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:13144-13149.
- Pellizzari, L., D'Elia, A., Rustighi, A., Manfioletti, G., Tell, G., Damante, G. (2000) Expression and function of the homeodomain-containing protein Hex in thyroid cells *Nucleic Acids Res.* **28**:2503-2511.
- Perrone, L., Pasca di Magliano, M., Zannini, M., Di Lauro, R. (2000) The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**:203-208.
- Plachov, D., Chowdhury, K., Walther, C., Simon, D., Guenet, J. L. and Gruss, P. (1990) Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland *Development* **110**:643-651.

- Poleev, A., Wendler, F., Fickenscher, H., Zannini, M. S., Yaginuma, K., Abbott, C. and Plachov, D. (1995) Distinct functional properties of three human paired-box-protein, PAX8, isoforms generated by alternative splicing in thyroid, kidney and Wilms' tumors *Eur. J. Biochem.* **228**:899-911.
- Poleev, A., Okladnova, O., Musti, A. M., Schneider, S., Royer-Pokora, B. and Plachov, D. (1997) Determination of functional domains of the human transcription factor PAX8 responsible for its nuclear localization and transactivating potential. *Eur. J. Biochem.* **247**:860-869.
- Price, M., Lazzaro, D., Pohl, T., Mattei, M. G., Ruther, U., Olivo, J. C., Duboule, D., Di Lauro, R. (1992) Regional expression of the homeobox gene Nkx-2.2 in the developing mammalian forebrain *Neuron* **8**:241-255.
- Puppini, C., D'Elia, A. V., Pellizzari, L., Russo, D., Arturi, F., Presta, I., Filetti, S., Bogue, C. F., and Damante, G. (2003) Thyroid-specific transcription factors control Hex promoter activity *Nucleic Acids Res.* **1**:1845-1852.
- Puppini, C., Presta, I., D'Elia, A. V., Tell, G., Arturi, F., Russo, D., Filetti, S., and Damante, G. (2004) functional interaction among thyroid-specific transcription factors: Pax8 regulates the activity of Hex promoter *Mol. Cell. Endocrin.* **214**:117-125.
- Raspe, E., Dumont, J.E. 1995 Tonic modulation of dog thyrocyte H₂O₂ generation and I⁻ uptake by thyrotropin through the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate cascade. *Endocrinology* **136**:965-73
- Santisteban, P., Acebron, A., Polycarpou-Schwarz, M., Di Lauro, R. (1992) Insulin and insulin-like growth factor I regulate a thyroid-specific nuclear protein that binds to the thyroglobulin promoter *Mol. Endocrinol.* **6**:1310-1317.
- Sinclair, A. J., Lonigro, R., Civitareale, D., Ghibelli, L. and Di Lauro, R. (1990) The tissue-specific expression of the thyroglobulin gene requires interaction between thyroid-specific and ubiquitous factors *Eur. J. Biochem.* **193**, 311-8.

- Stuart, E.T., Gruss, P. 1996 PAX: developmental control genes in cell growth and differentiation. *Cell Growth Differ* 7:405-12
- Taki, K., Kogai, T., Kanamoto, Y., Hershman, J.M., Brent, G.A. (2002) A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells. *Mol Endocrinol* 16:2266-2282.
- Tanaka, T., Inazu, T., Yamada, K., Myint, Z., Keng, V.W., Inoue, Y., Taniguchi, N., Noguchi, T. (1999) cDNA cloning and expression of rat homeobox gene, Hex, and functional characterization of the protein *Biochem. J.* 339:111-117.
- Thomas, P. Q., Brown, A., Beddington, R. S. (1998) Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors *Development*. 125:85-94.
- Van der Kallen, C.J., Spierings, D.C., Thijssen, J.H., Blankenstein, M.A., de Bruin, T.W. (1996) Distrupted co-ordination of Pax-8 and thyroid transcription factor-1 gene expression in a dedifferentiated rat thyroid tumor cell line derived from FRTL-5. *J Endocrinol* 150:377-382.
- Vilain, C., Rydlewski, C., Duprez, L., Heinrichs, C., Abramowicz, M., Malvaux, P., Renneboog, B., Parma, J., Costagliola, S., Vassart, G. (2001) Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8 *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:234-238.
- Walther, C., Guenet, J. L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M. D., Plachov, D., Balling, R., Gruss, P. (1991) Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes *Genomics* 11:424-434.
- Yan, C., Sever, Z., Whitsett, J. A. (1995) Upstream enhancer activity in the human surfactant protein B gene is mediated by thyroid transcription factor 1 *J. Biol. Chem.* 270:24852-24857.

- Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D., e Di Lauro, R. (1992) Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters *Mol. Cell. Biol.* **12**:4230-4241.
- Zannini, M., Avantaggiato, V., Biffali, E., Arnne, M., Sato, K., Pischetola, M., Taylor, B., Phillips, S., Simeone, A., and Di Lauro, R. (1997) TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation *Embo J.* **16**:3185-3197.
- Zhang, L., Whitsett, J. A., Stripp, B. R. (1997) Regulation of Clara cell secretory protein gene transcription by thyroid transcription factor-1 *Biochim. Biophys. Acta* **1350**:359-367.

INDICE

Introduzione	pag. 1
Scopo del progetto	pag. 13
Risultati	pag. 15
Discussione	pag. 27
Materiali e Metodi	pag.32
Bibliografia	pag. 39

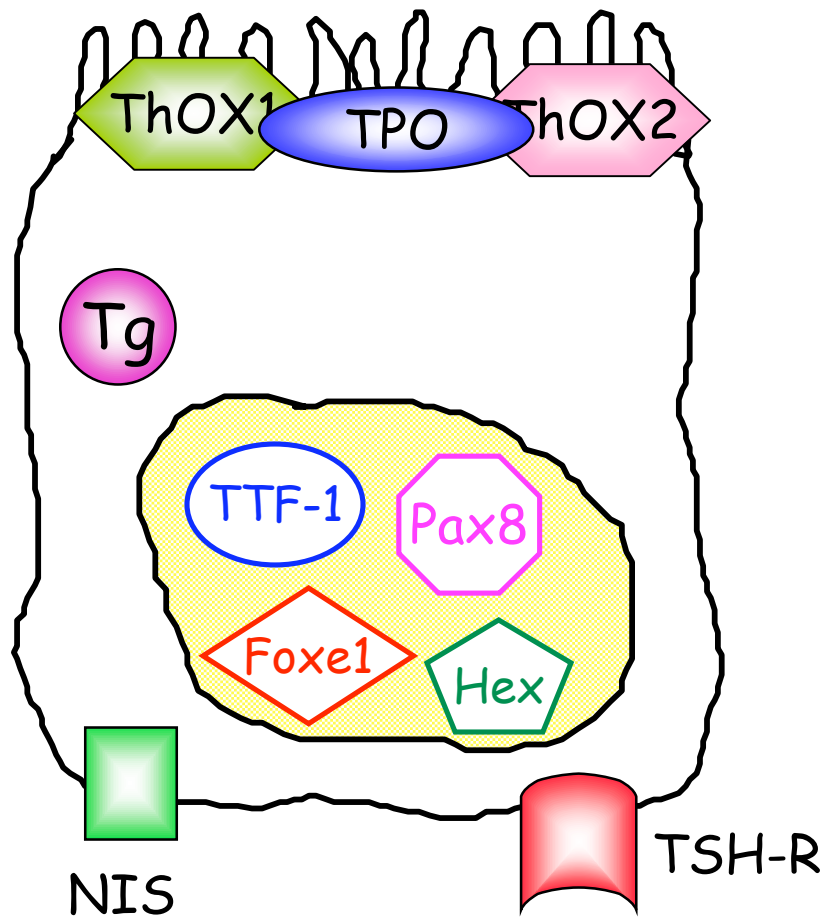
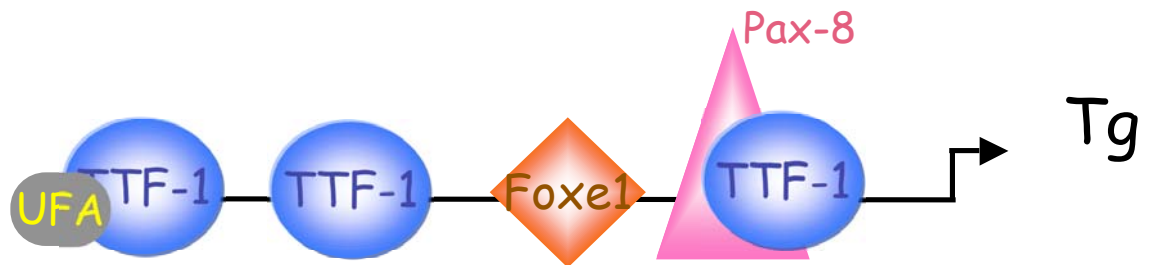


Figura 1: Rappresentazione schematica di una cellula follicolare tiroidea in cui e' possibile notare la polarita' delle molecole

A)



B)

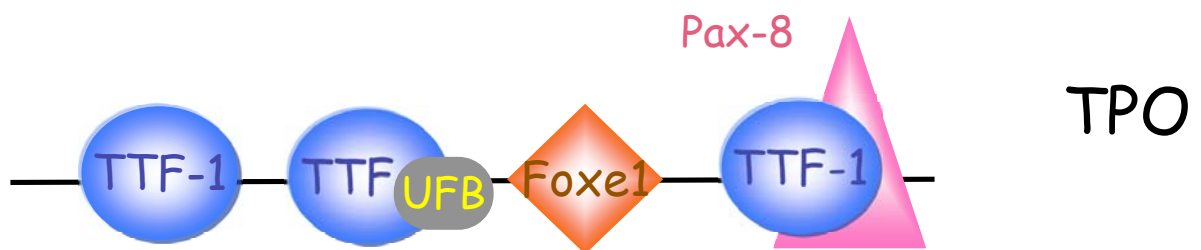


Figura 2: Rappresentazione schematica dei promotori della Tireoglobulina (A) e della Tireoperossidasi (B)

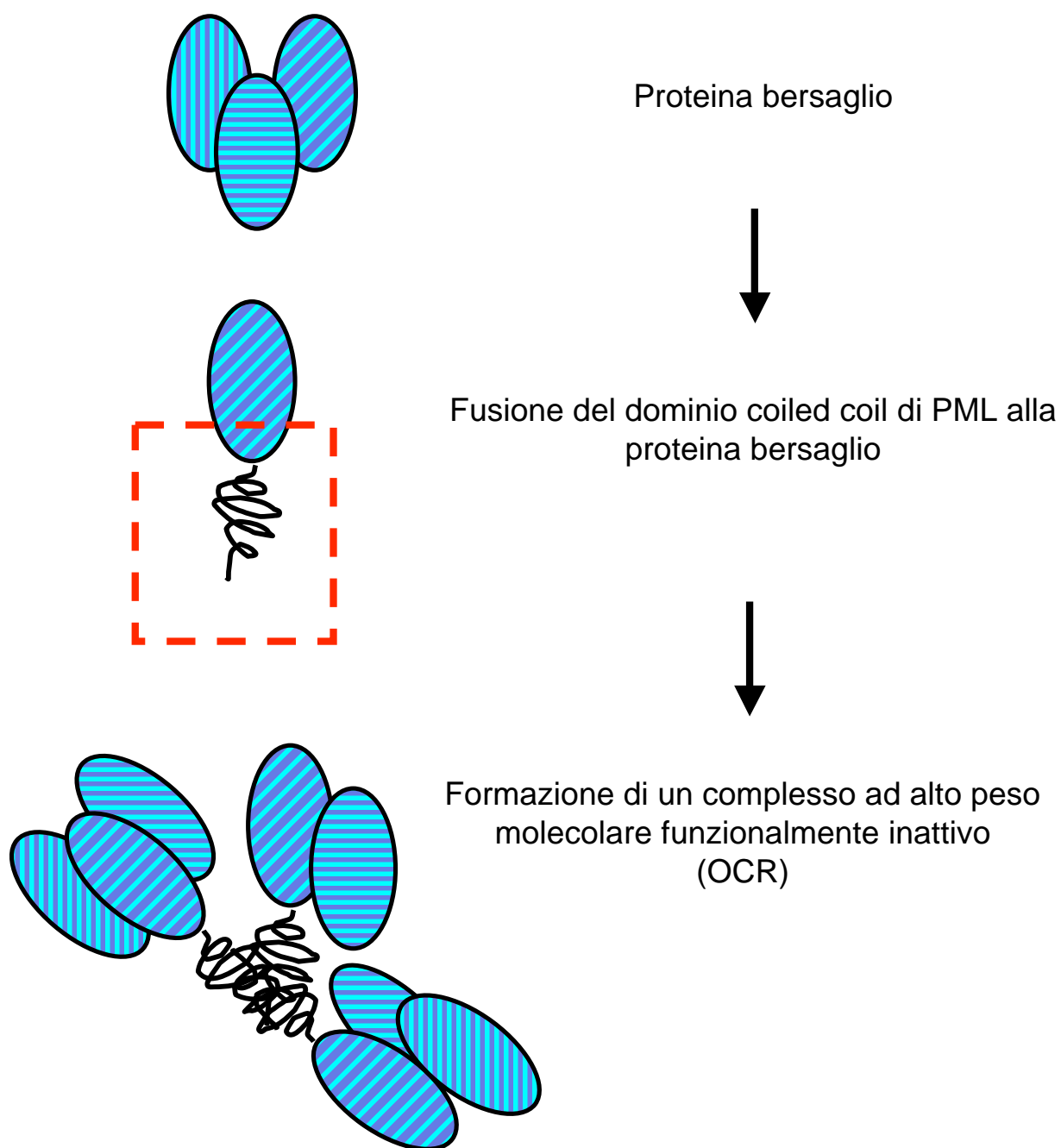


Figura 3: Rappresentazione schematica dell' Oligomerization Chain Reaction (OCR)

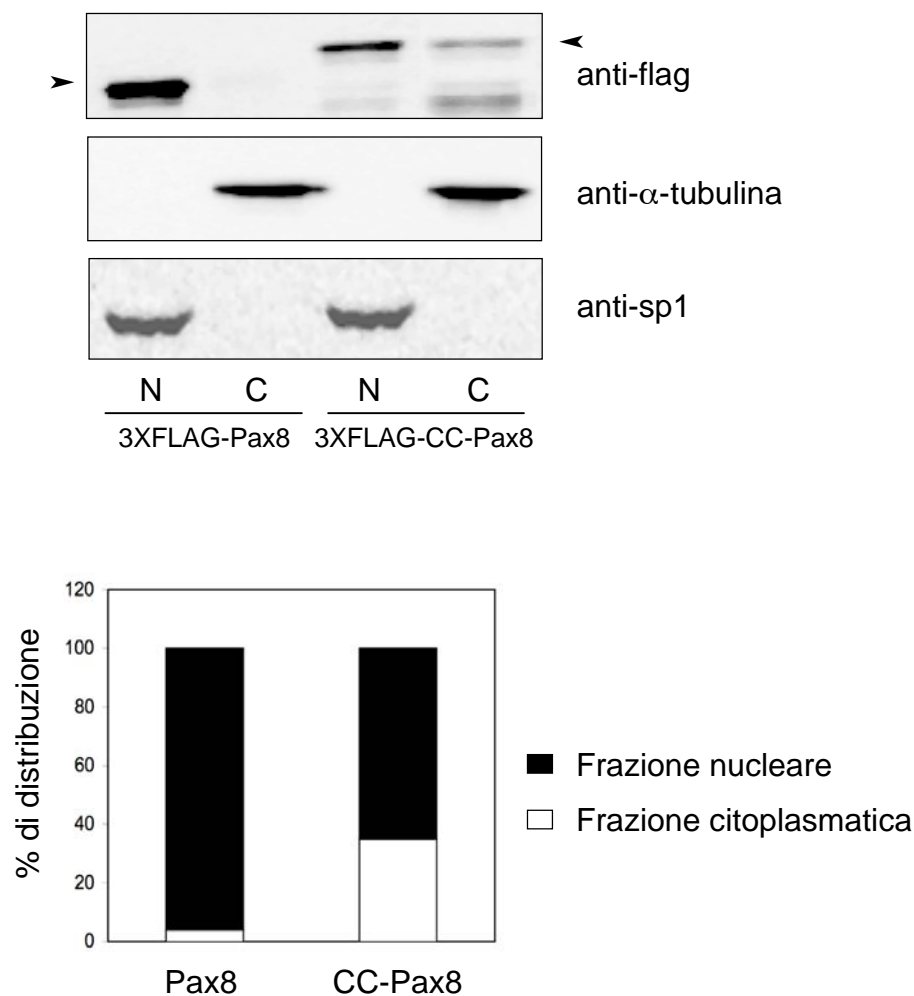


Figura 4: Localizzazione subcellulare della proteina chimerica CC-Pax8. Analisi mediante Western blot di estratti cellulari frazionati (N, frazione nucleare; C, frazione citoplasmatica) preparati da cellule HeLa trasfettate transientemente con i vettori di espressione 3XFLAG-CC-Pax8 e 3XFLAG-Pax8. Le proteine CC-Pax8 e Pax8, immunorivelate con un anticorpo anti-FLAG-M2, sono indicate dalle frecce. L'ibridazione con anti-tubulina e con anti-sp1 verifica la validita' dell'esperimento. Il grafico sottostante mostra il rapporto tra la frazione nucleare e la frazione citoplasmatica di ogni campione misurate mediante analisi densitometrica.

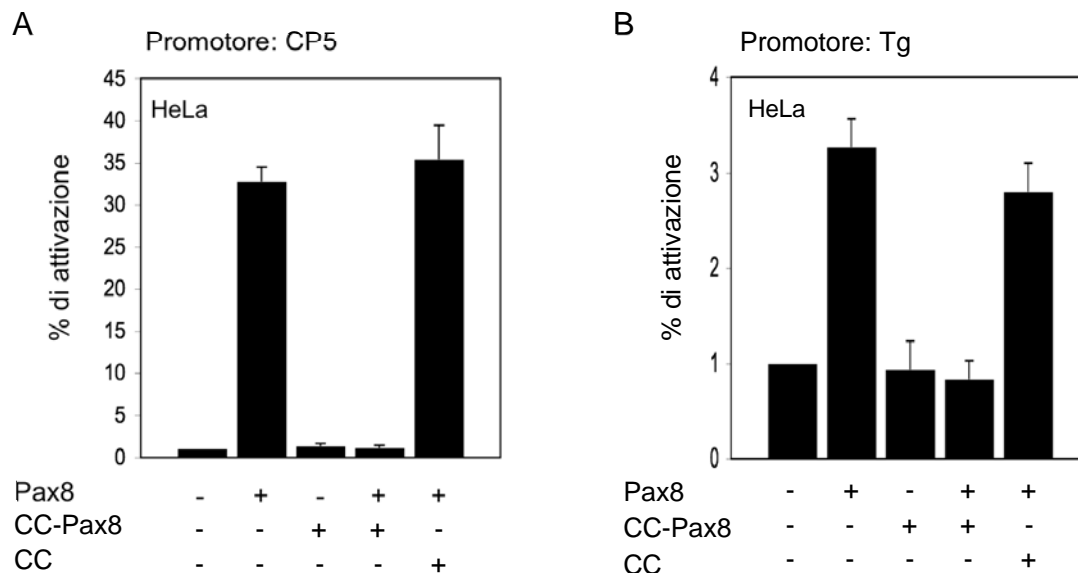


Figura 5: Effetti della proteina chimerica CC-Pax8 sull'attività trascrizionale di Pax8. Le cellule HeLa sono trasfettate transientemente con il plasmide reporter CP5-CAT (A) e con il plasmide reporter Tg-CAT (B), con o senza i vettori d'espressione codificanti le proteine Pax8, CC-Pax8 e il dominio CC in diverse combinazioni. Le cellule, in seguito raccolte, sono saggiate per l'attività CAT. Il percento d'attivazione è considerato come rapporto tra i valori ottenuti con e senza co-trasfezione dei vettori d'espressione. CMV-LUC è aggiunto come normalizzatore interno e i valori di CAT sono normalizzati sull'attività LUC. I valori sono la media \pm DS di tre esperimenti indipendenti.

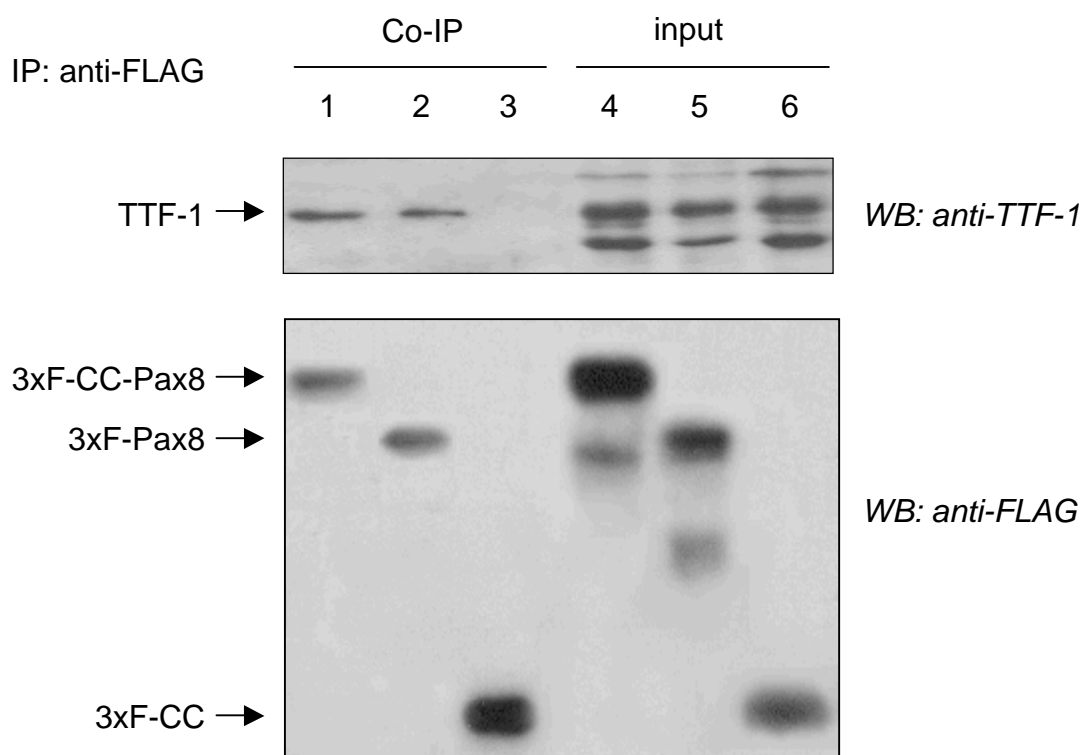


Figura 6: Interazione tra CC-Pax8 e TTF-1. 2 mg di estratto proteico totale sono incubati con anti-FLAG agarosio affinity gel. Le proteine eluite sono separate su un gel 10% SDS-PAGE e analizzate mediante Western blot con l'anticorpo anti-TTF-1 e in seguito con l'anticorpo anti-FLAG-M2. Canali 1 e 4, estratto proteico di cellule HeLa trasfettate transientemente con i vettori di espressione codificanti 3XFLAG-CC-Pax8 e TTF-1. Canali 2 e 5, estratto proteico di cellule HeLa trasfettate transientemente con i vettori di espressione codificanti 3XFLAG-Pax8 e TTF-1. Canale 3 e 6, estratto proteico di cellule HeLa trasfettate transientemente con i vettori di espressione codificanti 3XFLAG-CC e TTF-1.

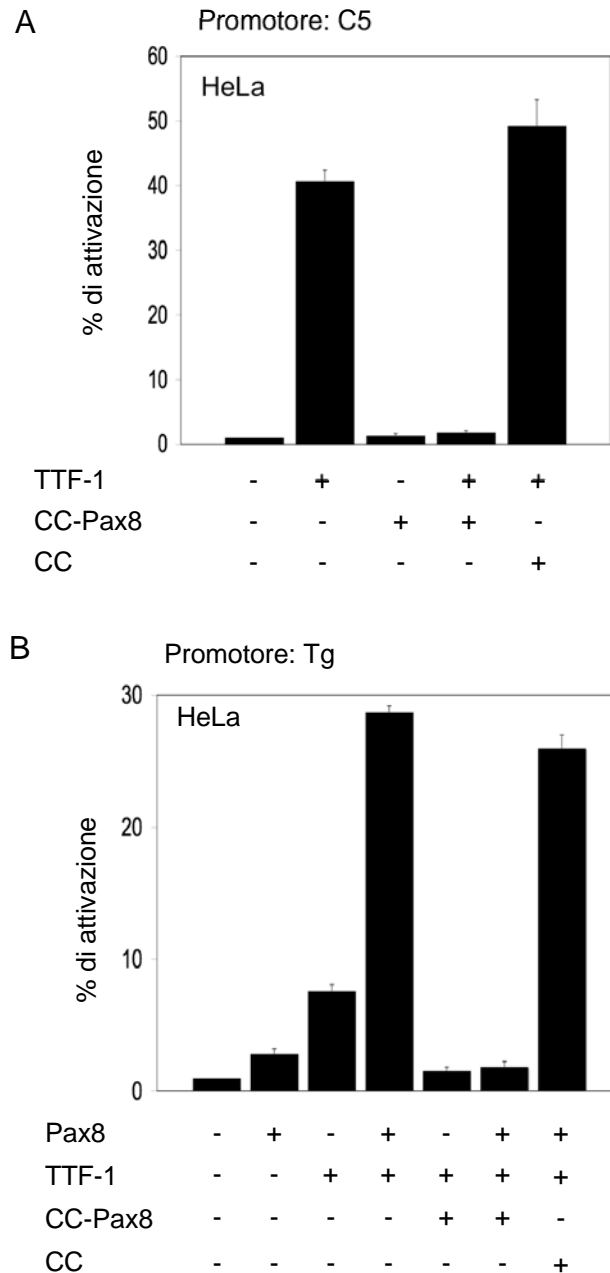


Figura 7: Effetti della proteina chimerica CC-Pax8 sull'attività trascrizionale di TTF-1. Le cellule HeLa sono trasfettate transientemente con il plasmide reporter C5-CAT (A) e con il plasmide reporter Tg-CAT (B), con o senza i vettori d'espressione codificanti le proteine TTF-1, Pax8, CC-Pax8 e il dominio CC in diverse combinazioni. Le cellule, in seguito raccolte, sono saggiate per l'attività CAT. Il per cento d'attivazione è considerato come rapporto tra i valori ottenuti con e senza co-trasfezione dei vettori d'espressione. CMV-LUC è aggiunto come normalizzatore interno e i valori di CAT sono normalizzati sull'attività LUC. I valori sono la media \pm DS di tre esperimenti indipendenti.

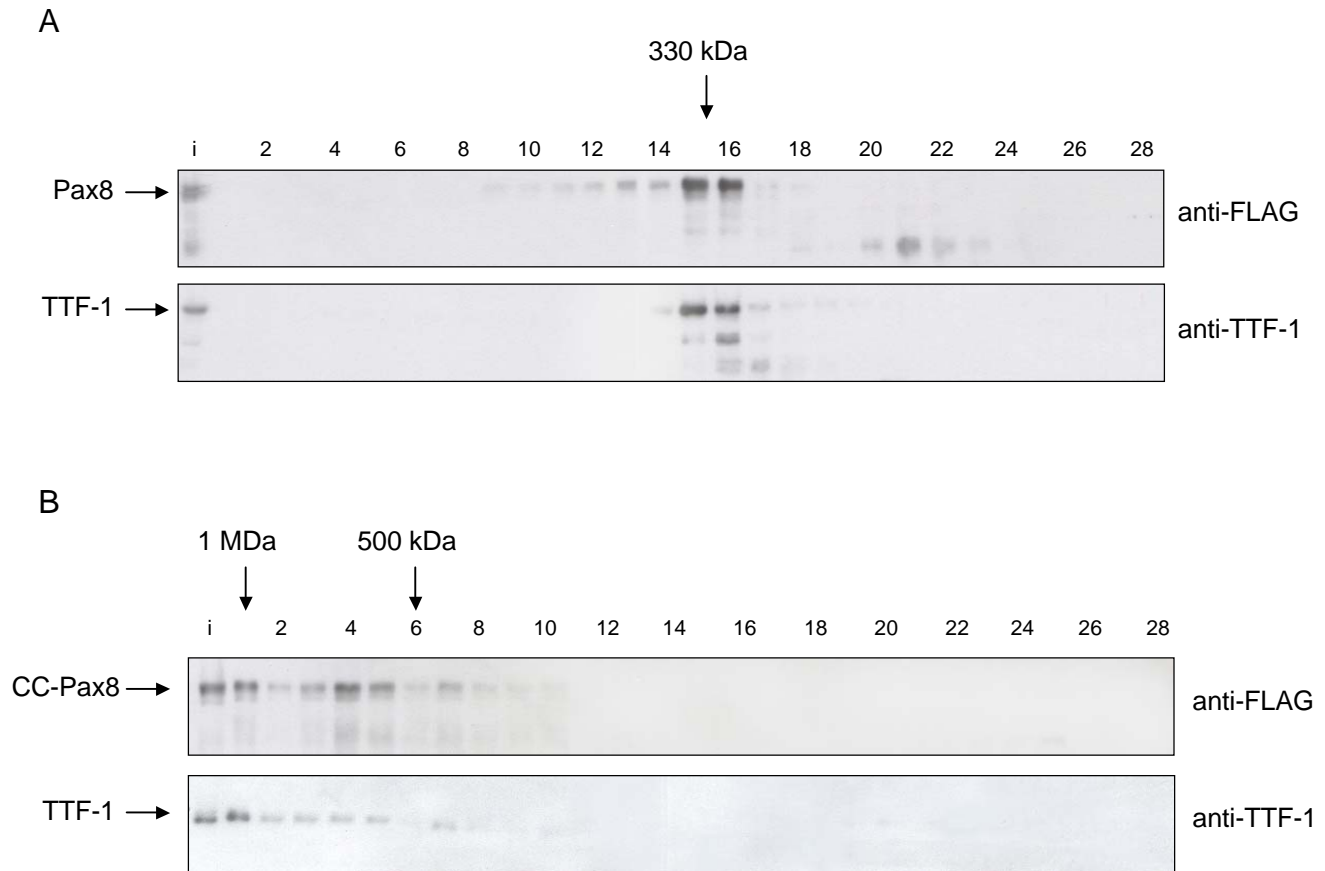


Figura 8: CC-Pax8 recluta TTF-1 in complessi ad alto peso molecolare. A) 1,5 mg di estratto totale derivante da cellule HeLa trasfettate transientemente con i vettori d'espressione codificanti le proteine Pax8 e TTF-1 e' stato frazionato mediante cromatografia ad esclusione molecolare sulla colonna di Sepharose 6HR. Le frazioni indicate sono analizzate su un gel 10% SDS-PAGE ed immunorivelate con gli anticorpi anti-FLAG-M2 e anti-TTF-1. Le frazioni contenenti il complesso Pax8/TTF-1 sono indicate dalla freccia e corrispondono ad un peso molecolare di circa 330 kDa. B) 1,5 mg di estratto totale derivante da cellule HeLa trasfettate transientemente con i vettori d'espressione codificanti le proteine CC-Pax8 e TTF-1 e' stato frazionato mediante cromatografia ad esclusione molecolare sulla colonna di Sepharose 6HR. Le frazioni indicate sono analizzate su un gel 10% SDS-PAGE ed immunorivelate con gli anticorpi anti-FLAG-M2 e anti-TTF-1. Le frazioni contenenti il complesso CC-Pax8/TTF-1 sono indicate dalle frecce e corrispondono ad un peso molecolare compreso tra i 500 kDa e 1 MDa.

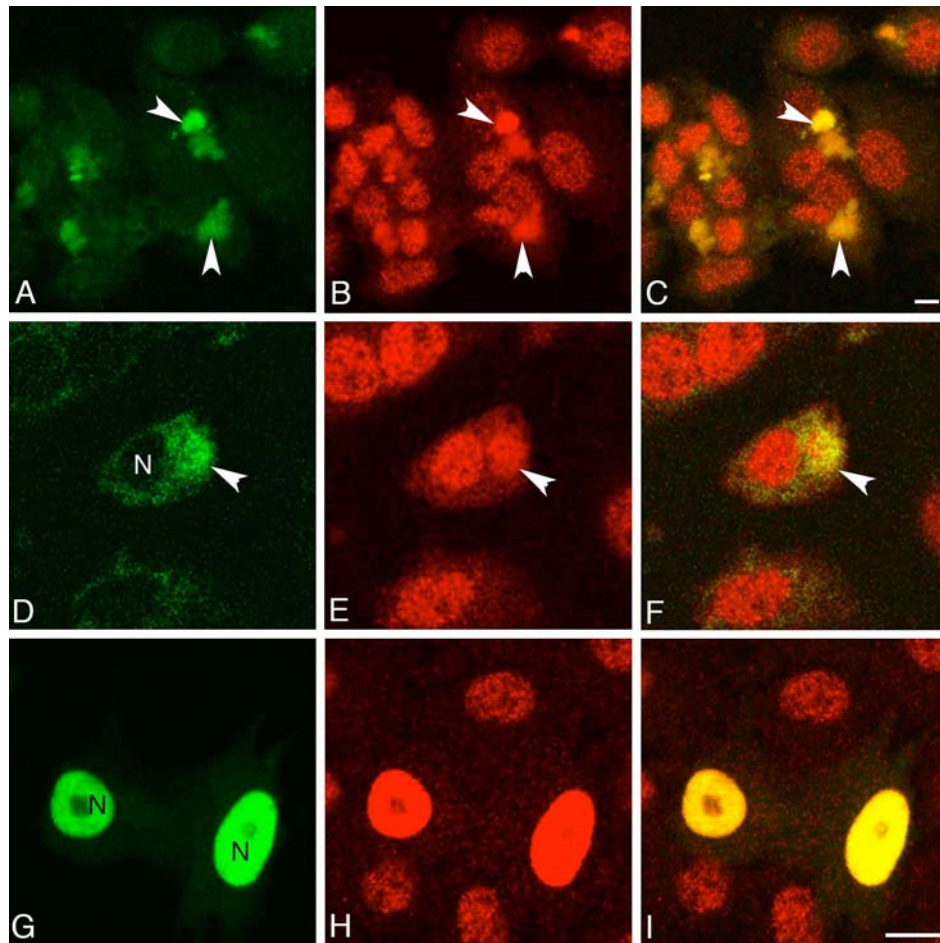
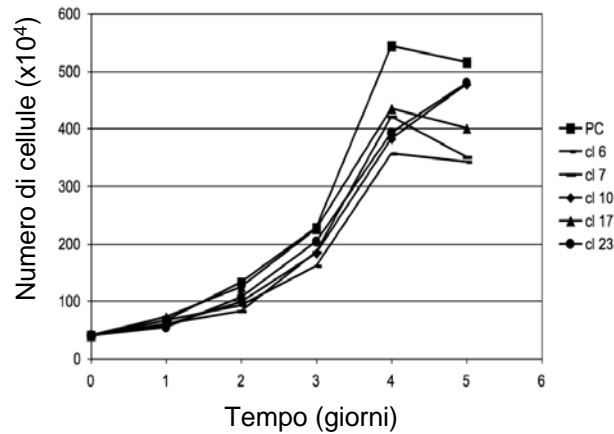


Figura 9: CC-Pax8 delocalizza TTF-1 nelle cellule tiroidee PC Cl3. Le cellule PC Cl3 cresciute direttamente su vetrino sono trasfettate transientemente con un vettore di espressione codificante la proteina CC-Pax8-EYFP (A-F), o con un vettore di espressione codificante Pax8-EYFP (G-I). Le cellule sono colorate per immunofluorescenza con l'anticorpo monoclonale anti-TTF-1 Ab-1 e successivamente esaminate mediante microscopia confocale. La fluorescenza della proteina CC-Pax8-EYFP e' rilevata prevalentemente in una regione perinucleare (A e D) dove e' concentrata in *clusters* (freccie bianche). Gli stessi *clusters* sono riconosciuti anche dall'anticorpo anti-TTF-1 (B e E). La sovrapposizione dei due segnali rivela la co-localizzazione di CC-Pax8-EYFP e di TTF-1 nelle stesse regioni extranucleari (C e F). Come atteso Pax8-EYFP e' localizzato nel nucleo delle cellule PC Cl3 (G) dove co-localizza con TTF-1 (H e I). N, Nucleo. Barra, 10 μ m.

A



B

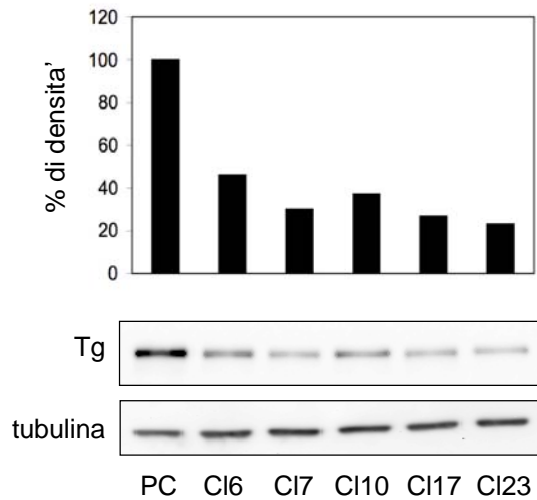


Figura 10: Effetti della proteina chimerica CC-Pax8 sulla proliferazione e il differenziamento delle cellule tiroidee. A) Misurazione dei parametri di crescita delle cellule PC CI3 e dei cloni CCP8 (CCP8-6, CCP8-7, CCP8-10, CCP8-17 e CCP8-23), mantenuti in mezzo completo per 6 giorni, mediante conta del numero di cellule effettuata ad intervalli regolari di 24 ore. B) Estratto proteico totale derivante da cellule PC CI3 e dai cloni CCP8 e' stato separato su un gel 7% SDS-PAGE ed immunorivelato con l'anticorpo policlonale specifico anti-Tg. L'ibridazione con anti-tubulina verifica l'uniformita' della concentrazione proteica dei campioni. Il grafico mostra l'analisi densitometrica delle bande corrispondenti alla proteina Tg.

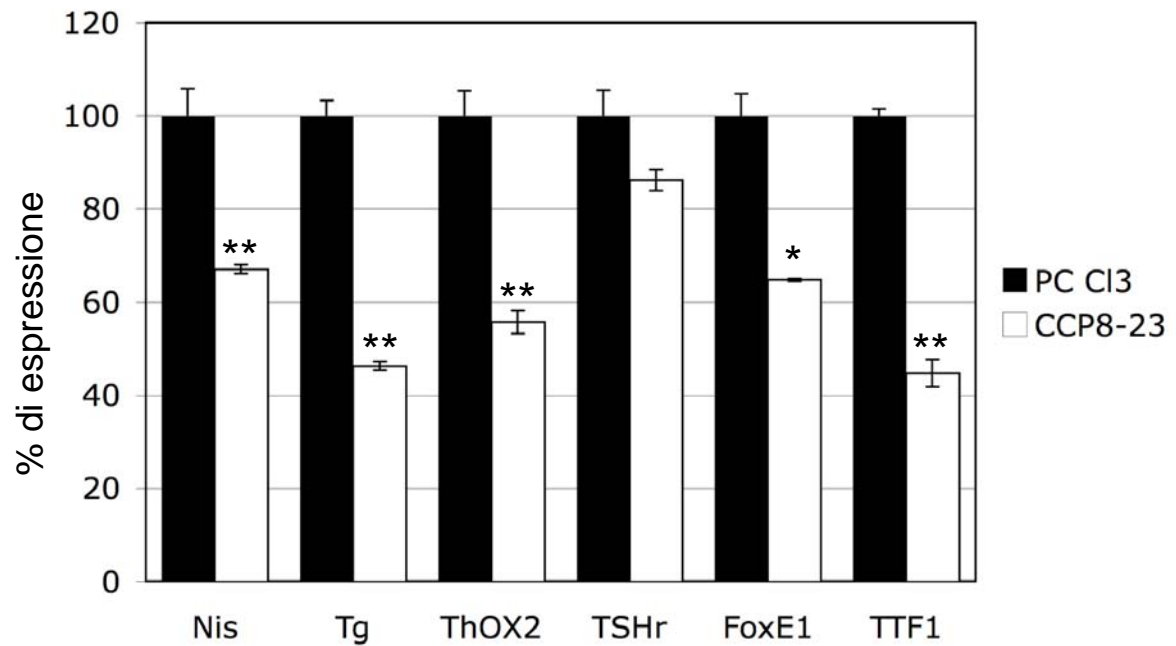


Figura 11: La proteina CC-Pax8 interferisce con l'espressione di geni tiroide-specifici. Il fenotipo deifferenziato del clone CCP8-23 e' analizzato mediante Q-PCR. Il grafico riporta l'espressione dei geni analizzati. Per ogni gene, i valori sono la media \pm DS di due esperimenti indipendenti, normalizzati per l'espressione del gene α 1-tubulina, e espressi come percentuale del valore misurato nelle cellule PC Cl3 *wild-type*. Per ogni gene analizzato e' stata effettuata una analisi statistica mediante il test "*t* di Student" per ottenere il valore *P* associato con le osservate differenze di espressione (**, $P < 0.004$; *, $P = 0.001$).

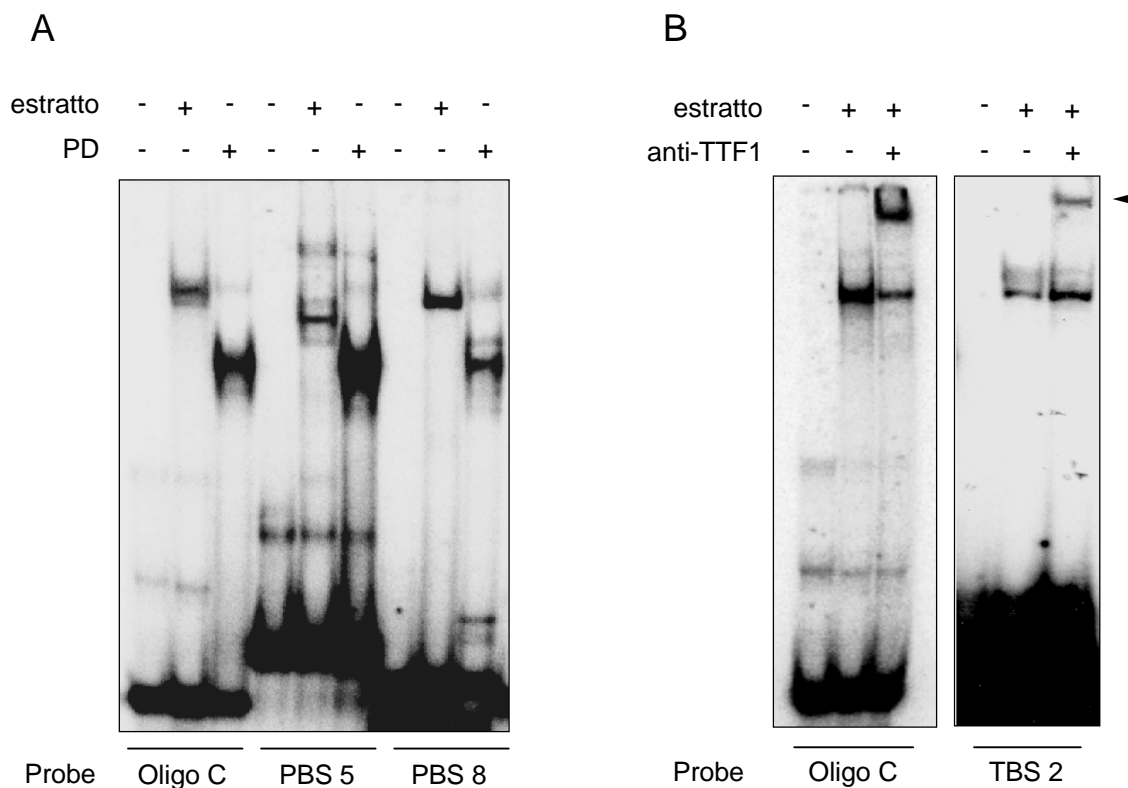


Figura 12: Pax8 e TTF-1 legano *in vitro* i siti di legame identificati. A) Saggio EMSA effettuato mediante incubazione di estratto nucleare di cellule PC Cl3 o del *paired domain* di Pax8 prodotto in batteri (indicato come PD) con gli oligonucleotidi contenenti il *Pax8-binding site 5* (PBS 5), il *Pax8-binding site 8* (PBS 8) e l'oligo C utilizzato come controllo positivo. B) Saggio EMSA effettuato mediante incubazione di estratto nucleare di cellule PC Cl3, con o senza l'anticorpo anti-TTF-1, con gli oligonucleotidi contenenti il *TTF-1-binding site 2* (TBS 2) e l'oligo C utilizzato come controllo positivo. La freccia indica il complesso DNA-proteina ad alto peso molecolare formatosi in seguito al riconoscimento da parte dell'anticorpo (*supershift*).

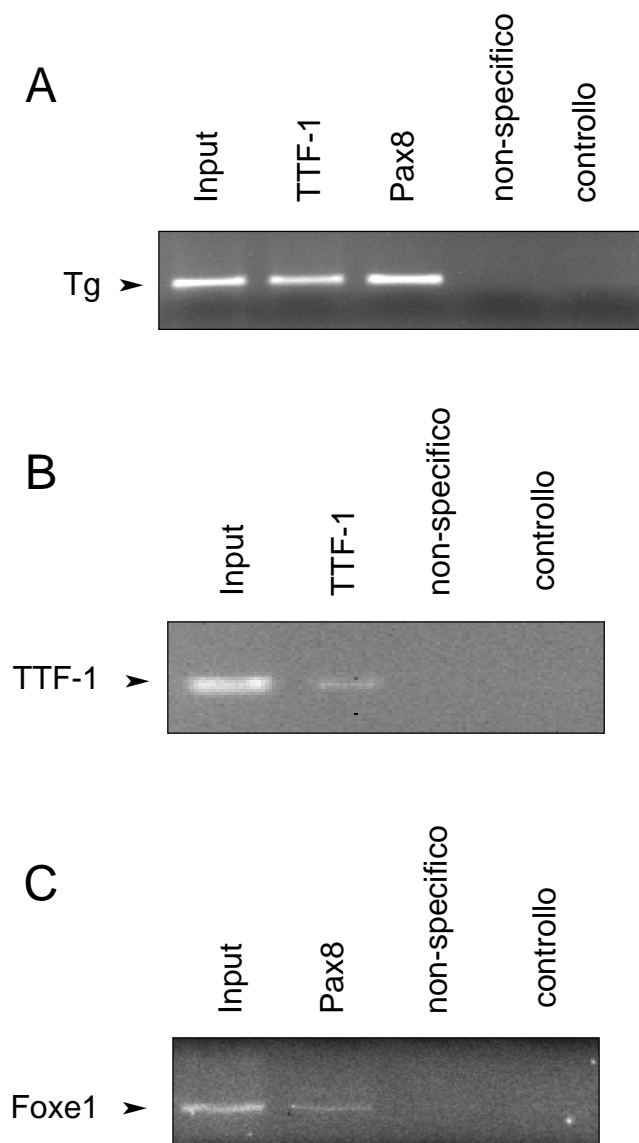


Figura 13: Pax8 e TTF-1 legano *in vivo* i siti di legame identificati. Esperimenti di ChIP effettuati sulle cellule PC Cl3 che mostrano il legame *in vivo* di Pax8 e TTF-1 al promotore di Tg (A), di TTF-1 al suo stesso promotore (B) e di Pax8 al promotore di Foxe1 (C).

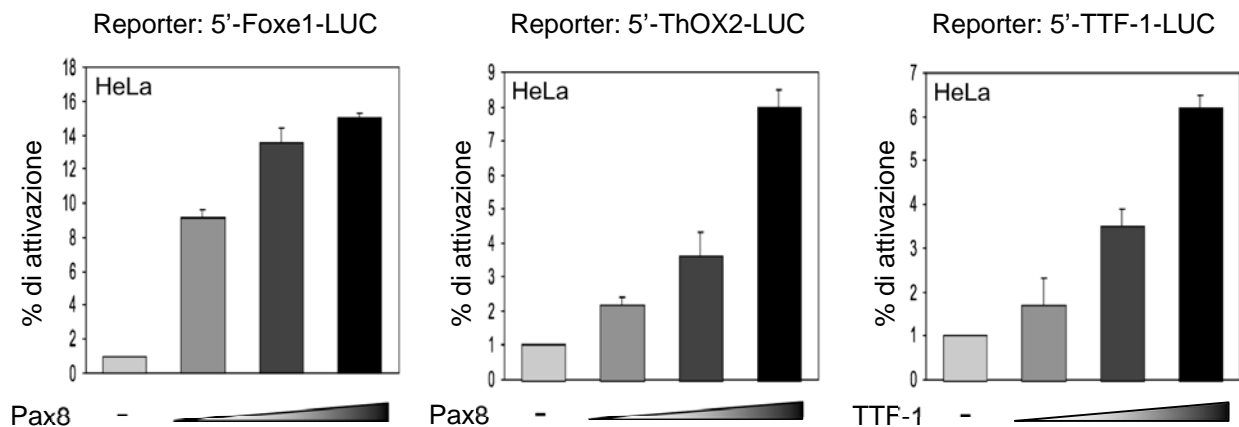


Figura 14: *Foxe1*, *ThOX2* e *TTF-1* sono bersagli diretti dell'azione di Pax8 e TTF-1. Le cellule HeLa sono trasfettate transientemente con i plasmidi reporter 5'-Foxe1-LUC, 5'-ThOX2-LUC e 5'-TTF-1-LUC con o senza concentrazioni crescenti dei vettori d'espressione codificanti le proteine Pax8 e TTF-1. Le cellule, in seguito raccolte, sono saggiate per l'attivit  CAT. Il percento d'attivazione   considerato come rapporto tra i valori ottenuti con e senza co-trasfezione dei vettori d'espressione. CMV-LUC   aggiunto come normalizzatore interno e i valori di CAT sono normalizzati sull'attivit  LUC. I valori sono la media \pm DS di tre esperimenti indipendenti.